

Der Einfluss des sensiblen Neurotransmitters SP und des sympathischen Nervensystems auf die enchondrale Ossifikation im Verlauf der Frakturheilung und auf die allgemeine Knochenstruktur *in vivo* und *in vitro*



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tanja Niedermair
aus
Freising

im Jahr
2015

Der Einfluss des sensiblen Neurotransmitters SP und des sympathischen Nervensystems auf die enchondrale Ossifikation im Verlauf der Frakturheilung und auf die allgemeine Knochenstruktur *in vivo* und *in vitro*



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tanja Niedermair
aus
Freising

im Jahr
2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: *Prof. Dr. Susanne Grässel*

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der Knochen	1
1.1.1 Entstehung des Knochens durch enchondrale und intramembranöse Ossifikation	1
1.1.2 Die wichtigsten Zelltypen im Verlauf der Knochenentwicklung	3
1.1.2.1 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	3
1.1.2.2 Chondrozyten	4
1.1.2.3 Osteoblasten	6
1.1.2.4 Osteoklasten	7
1.1.3 Die Struktur des Knochens	9
1.2 Primäre und sekundäre Frakturheilung	11
1.2.1 Induktion und Entzündungsphase (Phase 2-3)	12
1.2.2 Der weiche Kallus (Phase 4)	13
1.2.3 Die Phase der Kallus-Härtung/Ossifikation (Phase 5)	14
1.2.4 Die Wiederherstellung des ursprünglichen Knochens durch den geregelten Umbau der Knochenmatrix – das <i>Remodelling</i> (Phase 6)	15
1.2.5 Einfluss biomechanischer Kräfte auf die Kallusbildung	16
1.3 Innervierung des Knochens durch das sensible und sympathische Nervensystem	18
1.3.1 Der Einfluss des sensiblen und sympathischen Nervensystems auf die Frakturheilung	19
1.3.2 Substanz P - Neurotransmitter des sensiblen Nervensystems	19
1.3.3 Das sympathische Nervensystem und seine Neurotransmitter	22
2. Ziel der Arbeit	26
3. Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	28
3.1.2 Zellkulturmedien	31
3.1.3 Zusätze – Zellkultur	31
3.1.4 Puffer	33
3.1.5 Kits	33
3.1.6 Primäre Antikörper	34
3.1.7 Sekundäre Antikörper	35
3.2 Methoden	36
3.2.1 Mausstämme	36
3.2.2 Frakturmodelle	36
3.2.2.1 Stabilisierte Femurfrakturen	37

3.2.2.2 Unstabilisierte Tibiafrakturen.....	38
3.2.3 Bewegungsverhalten.....	39
3.2.4 Dynamic Plantar Aesthesiometer Test – Analyse der Berührungssensibilität	40
3.2.5 Vermessung der Frakturkalli	41
3.2.6 Kultivierung der Kallus-Explantatkulturen	42
3.2.7 Stimulation der Kallus-Explantatkulturen mit Interleukin-1 β , SP und NA	42
3.2.8 Isolierung primärer Knochenmarksmakrophagen und Osteoblasten.....	43
3.2.9 Differenzierung der Knochenmarksmakrophagen zu Osteoklasten	44
3.2.10 Differenzierung der Osteoblasten.....	44
3.2.11 Isolierung der RNA.....	45
3.2.11.1 RNA aus Kallus-Explantatkulturen.....	45
3.2.11.2 RNA aus Osteoblasten und Osteoklasten.....	46
3.2.12 RNA-Konzentrations-, Qualitätsbestimmung und cDNA Synthese	46
3.2.13 Quantitative real-time PCR.....	47
3.2.14 Zytotoxizitätstest (Laktatdehydrogenase-Test).....	49
3.2.15 BCA – Assay – Konzentrationsbestimmung von Proteinen	50
3.2.16 BrdU – Assay – Messung der Zellproliferation	50
3.2.17 Caspase 3/7 – Assay – Messung der Apoptoserate.....	50
3.2.18 Alkalische Phosphatase (ALP) – Assay – Messung der Osteoblasten-Aktivität.....	51
3.2.19 Kathepsin K – Assay – Messung der Osteoklasten-Aktivität	51
3.2.20 Herstellung der Paraffinpräparate der unstabilisierten Tibiafrakturen	52
3.2.21 Histologie und Immunfluoreszenz.....	52
3.2.21.1 Immunfluoreszenzfärbungen	53
3.2.21.2 Immunhistochemische Färbungen.....	53
3.2.22 Färbungen der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase	54
3.2.23 Morphometrische Analysen der Frakturkalli	55
3.2.23.1 Bestimmung des mesenchymalen, knorpeligen und kalzifizierten Gewebes im Frakturkallus	55
3.2.23.2 Bestimmung des Anteils hypertropher Chondrozyten im Softkallus	56
3.2.23.3 Bestimmung der Osteoklastenzahl im kalzifizierten Kallusgewebe	57
3.2.23.4 Bestimmung der Osteoblastenzahl im gesamten Kallus	57
3.2.24 Biomechanische Analysen	57
3.2.25 μ Ct – Analysen.....	59
3.2.26 Statistische Analysen.....	61
4. Ergebnisse	62

4.1 <i>In vivo</i> Analysen	62
4.1.1 Unterschiede im Bewegungsverhalten von SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen	62
4.1.2 Unterschiede in der Berührungssensibilität von SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen	63
4.1.3 Vermessung des Frakturkallus – Bestimmung von Gewicht, Volumen und Dichte	64
4.1.4 Expression des sensiblen Neurotransmitters SP und dessen Rezeptor NK1 im Frakturkallus von WT-Kontrollen	66
4.1.5 Expression des sensiblen Neurotransmitters SP und dessen Rezeptor NK1 im Frakturkallus SyX-Mäuse	67
4.1.6 Sympathische TH-positive Nervenfasern und AR-Expression auf Zellen im Frakturkallus von WT-Kontrollen	68
4.1.7 Sympathische TH-positive Nervenfasern im Frakturkallus von Tac1-/- Mäusen	70
4.1.8 Analyse der Gewebezusammensetzung in Frakturkalli von SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen	71
4.1.8.1 Prozentuale Verteilung des mesenchymalen, knorpeligen und knöchernen Kallusgewebes im Gesamtkallus während des Heilungsverlauf.....	71
4.1.8.2 Prozentualer Anteil des hypertrophen Knorpelgewebes am gesamten Softkallus-Gewebe	73
4.1.8.3 Anzahl an Osteoblasten im Kallusgewebe.....	74
4.1.8.4 Anzahl an Osteoklasten im kalzifizierten Kallusgewebe	75
4.1.9 Biomechanische Analysen der frakturierten und nicht-frakturierten Femora	77
4.1.9.1 Biomechanische Eigenschaften der nicht-frakturierten Femora	77
4.1.9.2 Biomechanische Eigenschaften der frakturierten Femora 21 Tage nach Fraktur.....	78
4.1.9.3 Vergleich der mechanischen Eigenschaften des neu gebildeten Knochens im Verlauf der Frakturheilung mit dem vorhandenen Knochen des nicht-frakturierten Beins	79
4.1.10 μ Ct – Analysen der frakturierten und nicht-frakturierten Femora	80
4.1.10.1 μ Ct – Analysen des verknöcherten Kallus 21 Tage nach Fraktur	80
4.1.10.2 Strukturelle Knochenparameter im linken frakturierten Femur in einem VOI proximal zum Frakturkallus	81
4.1.10.3 Strukturelle Knochenparameter im rechten kontralateralen, nicht-frakturierten Femur in einem proximalen VOI	83
4.1.10.4 Vergleich der strukturellen Knochenparameter der proximalen VOIs frakturierter Femora mit den proximalen VOIs nicht-frakturierter Femora	84
4.2 <i>In vitro</i> Analysen	85
3.2.1 Vergleich primärer Osteoblasten und Osteoklasten aus SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen	85
4.2.1.1 Primäre Osteoblasten aus SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen	86
4.2.1.2 Primäre Osteoklasten aus SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen	87
4.2.2 Analyse der Kallus-Explantatkulturen aus SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen unter Zellkulturbedingungen	89

4.2.2.1 Toxizitätstest der Überstände aus den Kallus-Explantatkulturen	89
4.2.2.2 Unterschiede in der Genexpression zwischen WT-Kontrollen und SyX-Mäusen.....	90
4.2.2.3 Unterschiede in der Genexpression zwischen WT-Kontrollen und Tac1-/- Mäusen	92
4.2.2.4 Genexpression in den Kallus-Explantatkulturen von WT-Kontrollen und Tac1-/- Mäusen nach zusätzlicher Stimulation mit SP.....	93
4.2.2.4.1 Genexpression von timp-1, -2 und -3 nach Stimulation mit SP und w/o IL-1 β	94
4.2.2.4.2 Genexpression von mmp-2, -3 und -14 nach Stimulation mit SP und w/o IL-1 β ...	95
4.2.2.4.3 Genexpression von IL-6 und MIP-2 nach Stimulation mit SP	97
4.2.2.4.4 Genexpression von cox-2 und iNos nach Stimulation mit SP.....	98
5. Diskussion	101
5.2 SP- und NK1R-Immunoreaktivität der Zellen im Kallusgewebe	101
5.2 TH-positive Nervenfasern und α 1D-, α 2B- und β 2-Adrenozeptor-Immunoreaktivität der Zellen im Kallusgewebe.....	102
5.3 Bewegungsverhalten gesunder Mäuse und das Schmerzempfinden nach Fraktur in SyX- und Tachykinin-1 -defizienten Mäusen	103
5.4 Die Deletion des Tachykinin-1 Gens und die SyX beeinflussen den Ablauf der Kallusreifung <i>in</i> <i>vivo</i>	106
5.5 Die Deletion des Tachykinin-1 Gens beeinflusst die biomechanischen und strukturellen Knochenparameter in frakturierten und nicht-frakturierten Beinen.....	107
5.6 Eine Syx beeinflusst die biomechanischen und strukturellen Knochenparameter in frakturierten und nicht-frakturierten Beinen	111
5.7 Vergleich der biomechanischen Eigenschaften und der strukturellen Parameter der frakturierten mit den nicht-frakturierten Beinen innerhalb und zwischen den Mausgruppen.....	115
5.8 Die Deletion des Tachykinin-1 Gens und die SyX beeinflussen die Genexpression in Kallus- Explantatkulturen	116
Zusammenfassung	121
Summary.....	124
Anhang	127
Danksagung	127
Eidesstattliche Erklärung.....	129
Lebenslauf	130
Veröffentlichungen.....	132
Abkürzungsverzeichnis	133
Literaturverzeichnis.....	136

1. Einleitung

1.1 Der Knochen

Das Skelett der Vertebraten besteht aus einer Vielzahl von Knochen, es fungiert zum einen als Stütze des Körpers und bietet den inneren Organen Schutz, andererseits bildet es auch ein Reservoir für hämatopoietische und mesenchymale Stammzellen (Vortkamp 2006). Die Knochen des Skeletts entwickeln sich aus Zellen, die aus drei unterschiedlichen embryonalen Zelllinien stammen. Das kraniofaziale Skelett entsteht aus Zellen der Neuralleiste, das Achsenskelett stammt vom paraxialen Mesoderm ab und die Gliedmaßen sind das Produkt von Zellen aus dem lateralen Mesoderm. Der Knochen aus dem kraniofazialen Skelett und Teile des Schlüsselbeins entstehen durch intramembranöse Ossifikation, wohingegen die übrigen Knochen im Skelett durch enchondrale Ossifikation entstehen (Olsen et al. 2000).

1.1.1 Entstehung des Knochens durch enchondrale und intramembranöse Ossifikation

Neuer Knochen, der durch intramembranöse Ossifikation entsteht, wird nicht durch den Zwischenschritt einer Knorpelanlage gebildet (Abb. 1 A).

Stattdessen werden mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells/MSCs) zum Ort, an dem der neue Knochen entstehen soll, rekrutiert und beginnen dort zu kondensieren. Die Form der Zellaggregation ähnelt dabei bereits der Form des späteren Knochens. Das Gewebe wird vaskularisiert und die MSCs differenzieren zu Osteoblasten und Osteozyten, welche direkt Osteoid (Knochenmatrix) ablagern, um so die Schädelknochen und Teile des Schlüsselbeins zu bilden (Ferguson et al. 1998, Mundlos and Olsen 1997).

Entsteht neuer Knochen durch enchondrale Ossifikation (Abb. 1 B), startet der Prozess ebenfalls mit der Kondensation der MSCs. Der Großteil der MSCs differenziert jedoch nicht direkt zu Osteoblasten, sondern zu Chondrozyten. Reife Chondrozyten produzieren eine Knorpelmatrix, die das Template für die Entwicklung des Knochens, die sog. "Anlagen", bildet. Diese Knorpelmatrix dehnt sich dann durch interstitielles und appositionelles Wachstum aus (Karsenty and Wagner 2002, Mackie et al. 2008).

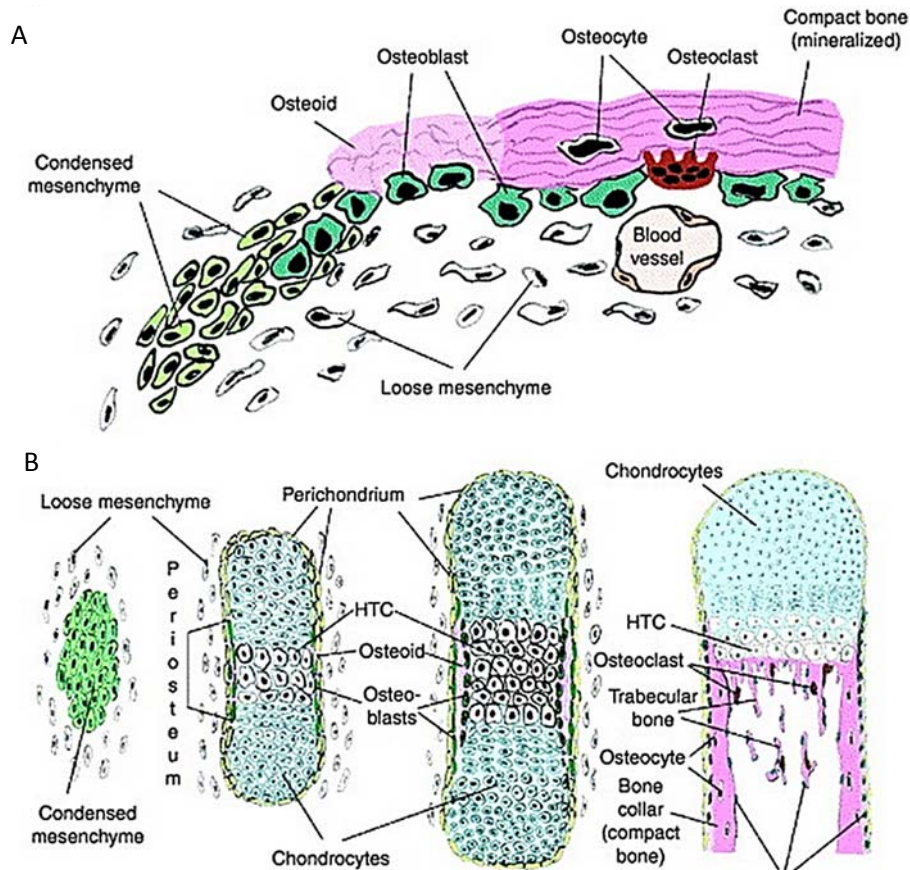


Abbildung 1: Schematische Darstellung der intramembranen (A) und der enchondralen Ossifikation (B) am Beispiel der Skelettentwicklung während der Embryogenese. HTC = hypertrophe Chondrozyten (Hartmann 2006)

Die äußere Zellschicht aus MSCs differenziert zu Osteoblasten, die das Periostium (die Knochenhaut) bilden und eine erste Schicht kalzifizierter Knochenmatrix, das Osteoid, um das knorpelige Template ablagern. Diese Osteoidschicht bildet eine Grenze, die das Dickenwachstum der Anlage eingrenzt und eine Barriere für Nährstoffe und Blutgefäße bildet. Chondrozyten im Zentrum der Anlagen beginnen zu hypertrophieren und kalzifizieren die von ihnen gebildete extrazelluläre Matrix (ECM), welche sie selbst oder Osteoklasten in einem weiteren Schritt degradieren. Durch die Osteoidschicht wachsen Blutgefäße und Nervenfasern ein und lagern sich an die Osteoidschicht an. Mit ihnen wandern Osteoprogenitorzellen ein, welche zu Osteoblasten differenzieren und eine weitere Schicht Osteoid an die bereits bestehende anlagern. Dieser Prozess wiederholt sich mehrere Male und bildet dadurch den mineralisierten Knochen. Der zentrale mid-diaphysäre Bereich bildet das primäre Ossifikationszentrum. Im Falle der Röhrenknochen entstehen zu beiden Seiten sog. Wachstumsfugen (growth plates), welche Chondrozyten in unterschiedlichen Stadien (proliferierend, differenzierend, terminal differenziert/hypertroph) enthalten. So expandiert die Anlage axial nach beiden Seiten und steuert dadurch das Längenwachstum. Die durch hypertrophe Chondrozyten kalzifizierte

Knorpelmatrix im Inneren des Osteoidmantels wird letztlich resorbiert und durch Knochenmark ersetzt (Bruder et al. 1994, Caplan 1987, Mundlos and Olsen 1997, Ortega et al. 2004).

1.1.2 Die wichtigsten Zelltypen im Verlauf der Knochenentwicklung

Die Entwicklung des Knochens ist ein kontinuierlicher Prozess, er beginnt in der Embryonalentwicklung und läuft im Erwachsenenalter in Form von Umbau- und Reparaturprozessen weiter. Die Hauptfaktoren, die eine erfolgreiche Knochenentwicklung vorantreiben, sind die Zellen, welche die Knochenmatrix generieren: Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten. Chondrozyten und Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs, sie differenzieren aus MSCs, Osteoklasten hingegen stammen von hematopoietischen Zellen (*hematopoietic stem cells/HSCs*) ab. Ohne ihre geregelte Differenzierung, Funktion und Interaktion könnte die skelettale Morphogenese nicht stattfinden (Erlebacher et al. 1995, Ferguson et al. 1998).

1.1.2.1 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

MSCs sind pluripotente Vorläuferzellen im embryonalen Gewebe, die eine hohe Teilungsfähigkeit besitzen. Sie besitzen zudem die Fähigkeit der Selbsterneuerung (*self renewal*) und können in mehr als einen Zelltyp differenzieren, aus denen dann Knochen, Sehnen, Bänder, Knorpel und Bindegewebe entstehen (Caplan 1991, Lajtha 1979, Oreffo et al. 2005). Auch im adulten Organismus konnten in einer Vielzahl von Geweben, wie Fettgewebe oder Knochenmark, MSCs nachgewiesen werden, die zu unterschiedlichen Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten differenzieren konnten (Caplan 1987, Ding et al. 2011, Prockop 1997).

In welche Richtung MSCs differenzieren hängt von extrinsischen und intrinsischen Faktoren ab. *In vitro* induzierte die Aussaat der Zellen in hoher Dichte (5×10^6 MSCs aus einem Kükenembryo pro 35 mm \varnothing Zellkulturschale) die chondrogene Differenzierung, eine geringere Zelldichte (2×10^6 MSCs aus einem Kükenembryo pro 35 mm \varnothing Zellkulturschale) führte zur Bildung von Osteoblasten (Caplan 1991). Eine serumfreie und *Transforming growth factor* (TGF) β -stimulierte Kultivierung von humanen MSCs (hMSCs) in Zellpellets führte zur Differenzierung Matrix-bildender Chondrozyten, eine osteogene Differenzierung wurde dagegen durch den Einfluss von Dexamethason, β -Glycerolphosphat, Ascorbat und Serum erreicht. Die Eigenschaften humaner und muriner MSCs scheinen im Hinblick auf Knorpel- und Knochenbildung unter Zellkulturbedingungen sehr ähnlich zu sein, wenn nicht sogar identisch (Pittenger et al. 1999).

1.1.2.2 Chondrozyten

Chondrozyten entstehen durch den Vorgang der Chondrogenese, der mit der Rekrutierung von MSCs beginnt, gefolgt von deren Proliferation und dem Prozess der Kondensation. Im Verlauf der Kondensation werden Gewebe-spezifische Faktoren exprimiert, die maßgeblich an der Chondrozytendifferenzierung während der Embryogenese beteiligt sind. Die Induktion der Expression des TGF- β sowie von Fibronektin, N-CAM und N-Cadherin initiiert die Zellkondensation und die Knorpeldifferenzierung (de Crombrugge et al. 2000, Goldring et al. 2006, Hall and Miyake 2000). In dieser Phase spielt der Transkriptionsfaktor Sox9 eine große Rolle. Dieser gehört ebenso wie L-Sox 5 und Sox 6 zu den *Sry-type HMG box* Proteinen. Während der Chondrogenese aktivieren sie die Expression des Chondrozyten-spezifischen Markergens Kollagen 2a1 (*Col2a1*), einer Splice-Variante des adulten Kollagen II, und die Genexpression anderer Knorpel-spezifischer Matrixproteine wie Kollagen 11a2 (*Col11a2*), Kollagen 9a1 (*Col9a1*) und Aggrekan (*Acan*) (Abb. 2) (Archer and Francis-West 2003, Lefebvre et al. 1997, Lefebvre et al. 1998).

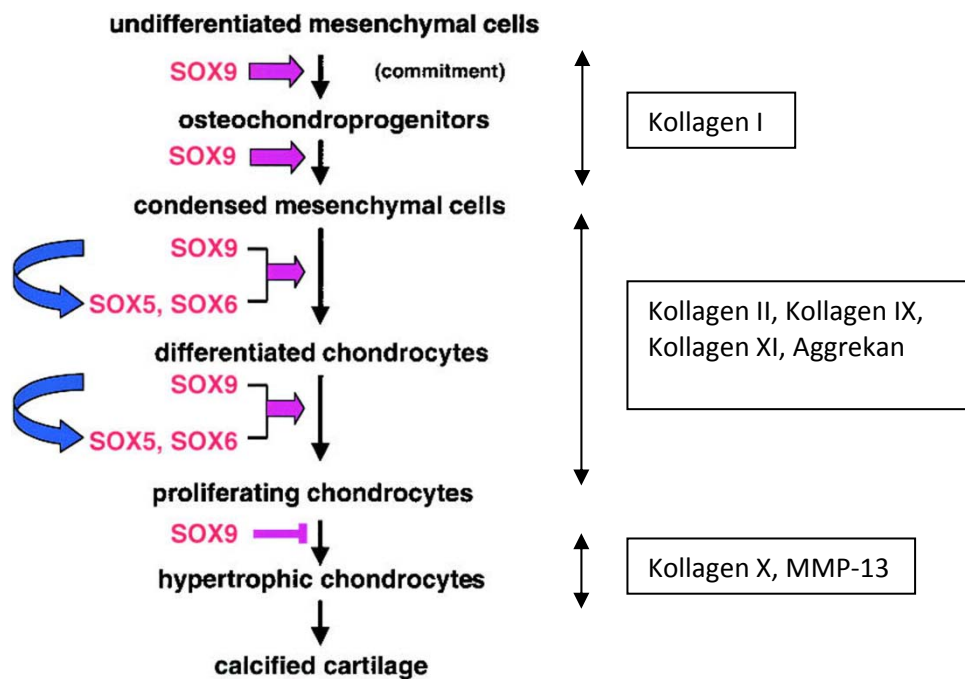


Abbildung 2: Schritte der Chondrozytendifferenzierung und Funktion von Sox-9, -5 und -6 im Verlauf der embryonalen Differenzierung. Pfeile stehen für eine Förderung des Differenzierungsprozesses, der Balken für eine Inhibition des Differenzierungsprozesses. Rechts wird die Produktion der wichtigsten Makromoleküle der Knorpelmatrix gelistet (modifiziert nach Akiyama et al. (2002)).

Im Anschluss an eine Proliferationsphase beginnen die Chondrozyten mit dem Prozess der terminalen Differenzierung, ein Vorgang der als Hypertrophie bezeichnet wird und durch eine starke

Zunahme des Zellvolumens gekennzeichnet ist. Zuerst wird sowohl die Zellmasse durch Produktion von Makromolekülen und Organellen erhöht, als auch das Volumen durch die Aufnahme von Flüssigkeit, ohne eine Veränderung der Zelldichte. In der zweiten Phase nimmt das Volumen der hypertrophierenden Chondrozyten durch reine Flüssigkeitsaufnahme zu (*Swelling*), was zu einer Verringerung der Zelldichte führt. In der dritten Phase erhöht sich das Volumen wieder proportional bei gleichbleibender Zelldichte, es werden sowohl Makromoleküle und Organellen produziert, als auch Flüssigkeit aufgenommen (Cooper et al. 2013, Goldring et al. 2006). Diese hypertrophe Phase ist für Chondrozyten der Endpunkt der Differenzierung. Entgegen der langjährigen Annahme, dass hypertrophe Chondrozyten schließlich durch Apoptose und Autophagie absterben, gibt es derzeit auch Studien die zeigen, dass hypertrophe Chondrozyten eine osteogene Transdifferenzierung durchführen und als Quelle für Osteoblasten dienen können (Pacifici et al. 1990, Shapiro et al. 2005, Yang et al. 2014a, Yang et al. 2014b).

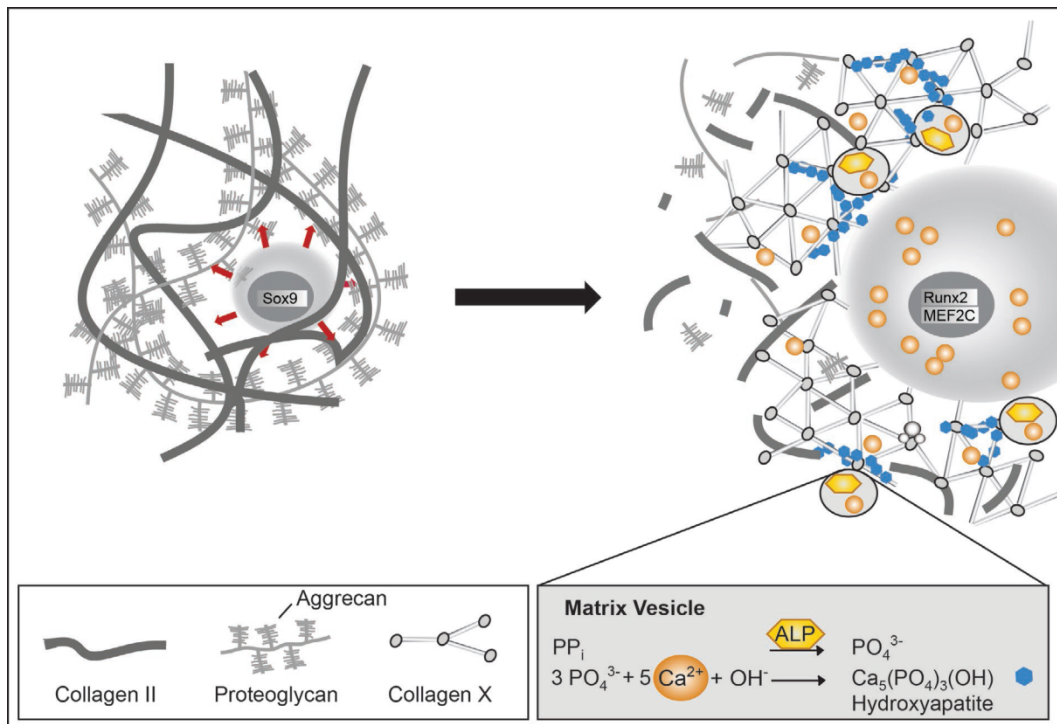


Abbildung 3: Die ECM der Chondrozyten. Reife Chondrozyten produzieren eine ECM, die hauptsächlich von Kollagen II und Aggrekan dominiert wird. Mit Beginn der hypertrophen Differenzierung wird die Kollagen II Produktion durch die Produktion des Kollagen X ersetzt, welches dann an Stelle von Kollagen II in die Knorpelmatrix eingelagert wird. Die Knorpelmatrix wird letztlich mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (ALP) und Kalzium (Ca^{2+}) kalzifiziert (Studer et al. 2012).

Die Hauptaufgabe eines reifen Chondrozyten besteht in der Synthese und dem Umbau einer spezifischen Knorpelmatrix, die hohen physikalischen Scher-, Zug- und Druckkräften widerstehen

Einleitung

kann. Die Knorpelmatrix spielt nicht nur während der Embryogenese eine wichtige Rolle, sondern auch im adulten Organismus, wie z.B. für die reibungslose Bewegung und Druckübertragung der Gelenke durch den artikulären Knorpel oder die Überbrückung von Frakturenden durch einen Softkallus und den dadurch erleichterten Heilungsprozess nach einem Knochentrauma (Muir 1995). Reife Chondrozyten sind in sog. "Lacunae" (Hohlräumen) innerhalb der von ihnen produzierten Matrix eingebettet und sind gleichermaßen für die Synthese der ECM-Makromoleküle und deren Abbau verantwortlich. Die Bestandteile der reifen Knorpelmatrix werden dominiert von Kollagen II und großen Chondroitin-/Heparansulfat-Proteoglykan-Aggregaten, wie Aggrekan und Hyaluronsäure (Abb. 3). Weitere wichtige Matrix-Moleküle, welche von den Chondrozyten gebildet werden, sind Kollagen IX und XI, Hyaluronsäure sowie ein Link-Protein und ein Gla-Protein (Archer and Francis-West 2003, Buckwalter and Mankin 1997, DeLise et al. 2000, Knudson and Knudson 2001, Kosher et al. 1986, Lin et al. 2006). Hypertrophieren die Chondrozyten, verringern sie die Kollagen II Produktion und exprimieren Kollagen X, das daher als Marker für hypertrophe Chondrozyten verwendet wird (Cremer et al. 1998, Linsenmayer et al. 1991, St-Jacques et al. 1999). In diesem Zusammenhang wird Kollagen II durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) degradiert, welche von hypertrophen Chondrozyten produziert wird. Anschließend wird Kollagen X in die Knorpelmatrix eingelagert und dient als Gerüst für die nachfolgende Kalzifizierung der Knorpelmatrix (Abb. 3) (Studer et al. 2012).

1.1.2.3 Osteoblasten

Die osteogene Differenzierung verläuft von MSCs über Osteoprogenitorzellen und Pre-Osteoblasten zu reifen Osteoblasten. Diese differenzieren terminal zu Osteozyten oder *lining cells*. Initial durchlaufen die Zellen eine Proliferationsphase, der sich eine weitere Differenzierungsphase anschließt, die durch die Expression Osteoblasten-spezifischer Gene, wie *ALP* und Kollagen I (*Col1*), gekennzeichnet ist. Terminal differenzierte Osteoblasten produzieren eine Reihe weiterer spezifischer Proteine wie Bone Sialoprotein (BSP), Osteocalcin (OC) und Osteopontin (OPN) und lagern eine knöcherne Matrix ab, die hauptsächlich aus Kollagen I, Kalzium und Phosphat besteht (Birmingham et al. 2012). Der Transkriptionsfaktor *Runt-related transcription factor 2* (*Runx2/Cbfa1*) wurde als einer der Schlüsselfaktoren in der osteogenen Differenzierung identifiziert, der während des gesamten Differenzierungszeitraums exprimiert wird und daher als Osteoblasten-Marker dient. *Runx2* reguliert die Expression der Gene für *Col1*, *OPN*, *BSP*, *OC* und anderen knochenspezifischen Genen. Zusätzlich ist *Runx2* an der Regulierung der Osteoblasten-Funktion beteiligt. Die Inaktivierung von *Runx2* während der Embryogenese der Maus führte zum Arrest der Differenzierung und zum Fehlen eines verknöcherten Skeletts (Ducy et al. 1997, Karsenty 2001, Komori et al. 1997, Otto et al.

1997). Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren sind β -Catenin und Osterix. Der β -Catenin-Signalweg inhibiert die Expression von Sox9 und fördert die Expression von Runx2 in mesenchymalen Zellen, wodurch die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Zellen initiiert wird. Osterix übt seinen Einfluss auf die Differenzierung in einer dem Runx2 nachfolgenden Ebene aus. Pre-Osteoblasten besitzen noch die Fähigkeit, die chondrogene Differenzierung einzuschlagen. Osterix agiert in den Pre-Osteoblasten als negativer Regulator von Sox9 und 5, wodurch es die Differenzierung zu Chondrozyten verhindert und so die Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen, Matrix-bildenden Osteoblasten fördert (Day et al. 2005, Komori 2006, Nakashima et al. 2002).

Osteoblasten produzieren die inorganischen und organischen Bestandteile der Knochenmatrix. Kollagen I, das den größten Anteil der organischen Phase bildet, wird in Form von Triple-Helices als Gerüst verwendet, in dessen Zwischenräume inorganische Kalzium-Hydroxyapatit (HA) Kristalle eingelagert werden. Zur Bildung der Kristalle benötigen Osteoblasten große Mengen an Kalzium (Ca^{2+}) und Phosphat Ionen, die in Membran-gebundenen *matrix vesicles*/MV gelagert werden. Um Phosphat-Ionen zu generieren, bilden Osteoblasten eine Gewebe-unabhängige ALP (*tissue-nonspecific alkaline phosphatase*/TNAP), die extrazelluläres Diphosphat zu Phosphat hydrolysiert. Die geregelte Enzymaktivität der ALP ist für den Mineralisierungsprozess maßgeblich. Durch eine kontrollierte Koexpression von Kollagen I und ALP wird so direkt die Kalzifizierung der Knochenmatrix reguliert. (Sapir-Koren and Livshits 2011, Wennberg et al. 2000).

1.1.2.4 Osteoklasten

Zu Beginn der Osteoklastogenese differenzieren hematopoietische Stammzellen (HSCs) zu myeloiden Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor*/CMP) (Abb. 4) (Akashi et al. 2000). Im weiteren Verlauf der Differenzierung passieren die Zellen einige Zwischenstufen, die *colony-forming unit for granulocytes and macrophages*/CFU-GM und die *CFU for macrophages*/CFU-M, bevor sie die Stufe eines Pre-Osteoklasten erreichen (Bar-Shavit 2007, Tondravi et al. 1997).

Einleitung

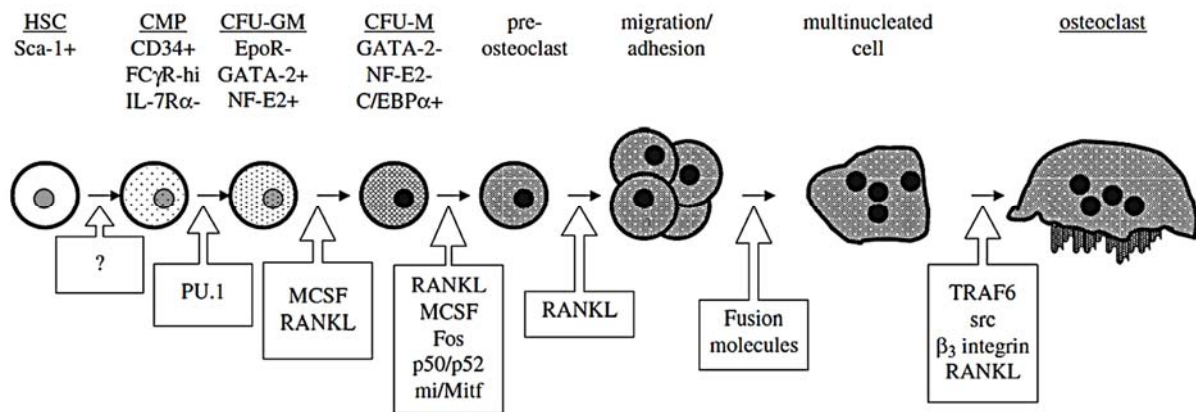


Abbildung 4: Osteoklasten Differenzierung. Der Verlauf der Differenzierung ausgehend von hematopoietischen Stammzellen über die Zwischenstufen der *common myeloid progenitor*/CMP sowie der *colony-forming unit for granulocytes and macrophages*/CFU-GM und der CFU-M bis zur Bildung multinukleärer Osteoklasten durch Fusion (Rubin and Greenfield 2005).

Die Bildung multinukleärer Osteoklasten durch Fusion mononukleärer Vorläufer wird durch das Zytokin *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und dem *Receptor activator of NF-κB ligand* (RANKL), einem Mitglied der Tumornekrosefaktor Superfamilie, bewirkt. M-CSF fördert die Proliferation von Osteoklastenvorläufern und die Differenzierung zu reifen Osteoklasten, es wird von Zellen in die Umgebung abgegeben, kommt aber im Knochen auch gebunden auf der Oberfläche von Knochenzellen vor. Die Stimulation des *Receptor activator of NF-κB* (RANK) durch seinen Liganden RANKL führt zur vollständigen Differenzierung, d.h. zur vollen Entwicklung des Osteoklasten-Phänotyps. Dieser ist gekennzeichnet durch die Expression des Calcitonin-Rezeptors, der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (*tartrate-resistant acid phosphatase*/TRAP) und des Enzyms Kathepsin K, welche den Osteoklasten die Fähigkeit verleihen die Knochenmatrix zu resorbieren. Die Verbindung beider Faktoren M-CSF und RANKL ist notwendig, um die Expression der Osteoklastenspezifischen Gene zu induzieren (Boyle et al. 2003, Rubin and Greenfield 2005, Tanaka et al. 1993).

Durch konzertierte Prozesse der reifen Osteoklasten wird die Degradation der organischen und mineralischen Bestandteile der Knochenmatrix initiiert. Im ersten Schritt haftet sich der Osteoklast an der Knochenmatrix an. Es bilden sich ein Aktin-Ring und eine *sealing zone*, wodurch die entstandene Resorptionsspalte (*resorption lacuna*) zwischen Osteoklast und Knochenmatrix fest von der Umgebung abgeschirmt wird. Dann bildet sich die sogenannte *ruffled border* aus, an welcher die Resorption der Knochenmatrix stattfindet. Schließlich werden Protonen und Kollagen-spaltende Enzyme wie Kathepsin K in die zwischen der Knochenmatrix, der *sealing zone* und der *ruffled boarder* entstandenen Resorptionsspalte abgegeben. Es kommt zur Ansäuerung des Milieus und zum Abbau der Matrix. Zuletzt werden die Abbauprodukte aus der Resorptions-Spalte über Transzytose entfernt und in die Umgebung abgegeben (Bar-Shavit 2007, Gowen et al. 1999, Kalervo Väänänen et al. 1996,

Ross and Teitelbaum 2005, Teitelbaum and Ross 2003). Ein weiteres Enzym, das an der Resorption der Knochenmatrix beteiligt ist, ist die TRAP, sie wird von aktiven Osteoklasten in großen Mengen produziert und dient somit als histochemischer und biochemischer Osteoklasten-Marker (Minkin 1982).

1.1.3 Die Struktur des Knochens

Die kalzifizierte Knochenmatrix setzt sich aus 70% inorganischen und 25% organischen Bestandteilen sowie 5% Wasser zusammen. Die inorganische Phase besteht zum größten Teil aus Hydroxyapatit; der kristalline Komplex aus Kalzium und Phosphat verleiht der Knochenmatrix ihre Steifigkeit. Kollagen I bildet in Form von Fibrillen den Hauptbestandteil der organischen Phase neben kleineren Mengen an Kollagen II, III, V und X sowie einigen anderen Proteinen (*noncollagenous proteins/NCPs*) wie Osteonectin, Osteocalcin, Bone Sialoprotein oder Proteoglykanen. Zudem befinden sich auch funktionale Komponenten wie Wachstumsfaktoren und Zytokine im Knochen (Marks and Popoff 1988, Kini and Nandeesh 2012). Das Skelett wird hauptsächlich aus zwei Arten von Knochen gebildet: dem massiven, kortikalen Knochen (*Substantia compacta/compact bone*) und dem Waben-artigen trabekulären Knochen (*Substantia spongiosa/spongy bone trabeculae*) (Abb. 5). Die Knochenmatrix beider Knochentypen wird in der Regel durch eine Lamellenstruktur gebildet, in der die Kollagenfibrillen in alternierender Richtung aneinander gelagert werden, die so gebildete Knochenmatrix wird daher auch Lamellenknochen genannt. Durch die lamellenartige Orientierung der Kollagenfibrillen wird zum einen eine dichte, flache Matrixstruktur, zum anderen eine helikale Matrixstruktur aus mehreren einzelnen Schichten, ein sogenanntes Osteon, gebildet (Abb. 5). Sowohl der flache Lamellenknochen, wie auch das Osteon besitzen die optimalen mechanischen Eigenschaften für die funktionellen Ansprüche an die Knochenmatrix (Sisask 2009). Wird Knochen schnell gebildet, auf Grund von Umbau- oder Reparaturprozessen, liegen die Kollagenfibrillen vorerst desorganisiert aneinander und bilden einen Faser- bzw. Geflechtknochen. Diese desorganisierte Struktur der Kollagenfibrillen macht den Faserknochen instabiler als den Lamellenknochen, er wird daher in späteren *Remodelling*-Prozessen zu Lamellenknochen umgebaut (Clarke 2008, Kini and Nandeesh 2012).

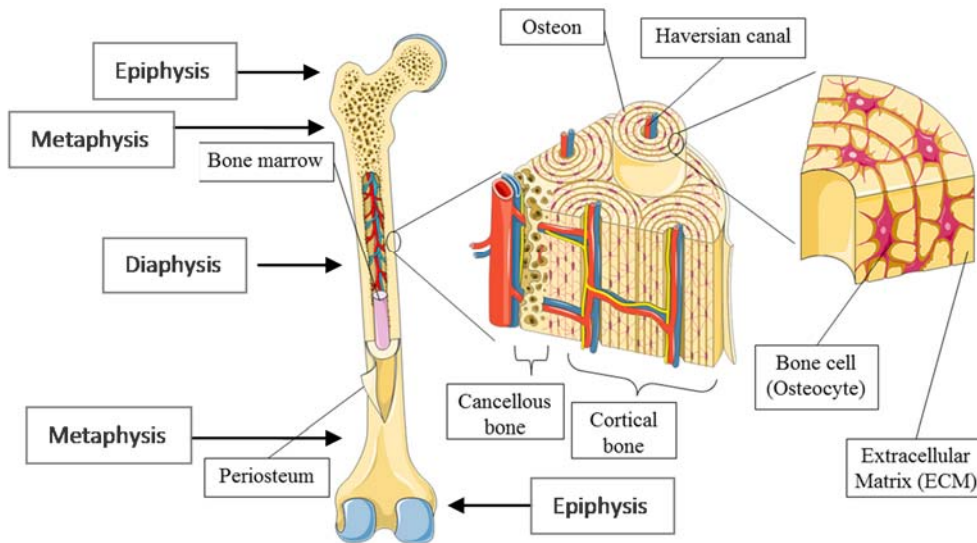


Abbildung 5: Schematische Übersicht des Röhrenknochens und der Knochenmatrix. Links dargestellt ist ein Röhrenknochen mit Diaphyse (Diaphysis) Metaphyse (Metaphysis) und Epiphyse (Epiphysis), dem Periosteum und dem Knochenmark. Rechts dargestellt ist die Knochenmatrix mit dem kompakten, kortikalen Knochen (cortical bone) und dem trabekulären Knochen (cancellous bone) sowie die Haversschen Kanäle (Haversian canals) die von Blut- und Lymphgefäßen (blood vessels, lymphatic vessels) durchzogen werden; modifiziert nach Bao et al. (2013).

Durch den Aufbau aus massivem, kortikalem Knochen und Waben-artigem trabekulärem Knochen (Abb. 5) erhält der Knochen seine biomechanischen Eigenschaften: leicht, steif, nicht porös und stabil gegen Zugspannung. Alle Knochen setzen sich in verschiedenem Maß aus kortikalem und trabekulärem Knochen zusammen. Ca. 8% des Skeletts bestehen aus kortikalem Knochen, er ist steif, besitzt eine dichte Struktur und kann hohen Belastungen standhalten. Der trabekuläre Knochen liegt innerhalb des kortikalen Knochens und besitzt eine weniger dichte und mechanisch belastbare Struktur (Ng et al. 1997). Der kortikale Knochen besitzt auf der äußeren Oberfläche eine Gewebeschicht, das Periosteum, welches von Blutgefäßen und Nervenfasern durchzogen wird und Osteoblasten und Osteoklasten enthält. Die innere Fläche wird durch eine Membranstruktur begrenzt, das Endosteum. Es überzieht den kortikalen und trabekulären Knochen und steht dadurch in Verbindung mit dem Knochenmarkskanal und dem Knochenmark im Inneren des Knochens. Zudem bedeckt es die Haverssche Kanäle, die von Blutgefäßen und Nervenfasern durchzogen werden und den Knochen vaskularisieren (Clarke 2008, Kini and Nandeesh 2012).

Es gibt aus morphologischer Sicht vier Knochen-Kategorien im adulten Skelett: Lang- oder Röhrenknochen wie Humerus, Femur oder Tibia, kurze Knochen wie Patella oder Fußwurzelknochen, flache Knochen wie die Schädelknochen sowie irreguläre Knochen wie das Sacrum oder das

Steißbein. Langknochen bestehen aus der Diaphyse, den Metaphysen und den Epiphysen. Die Diaphyse ist ein langer, hohler Schaft an den die flachen, konischen Metaphysen auf beiden Seiten anschließen. Abschließend befinden sich an beiden Enden der Langknochen die Epiphysen, welche durch die Wachstumsfuge von den Metaphysen abgetrennt sind (Abb. 5) (Clarke 2008).

1.2 Primäre und sekundäre Frakturheilung

Knochen hat die besondere Eigenschaft, dass er nach einem Trauma nicht durch die Bildung eines Ersatz- bzw. Narbengewebes, sondern durch die Bildung eines mechanisch und strukturell vollwertigen Knochengewebes heilt (Einhorn et al. 1989, Marsell and Einhorn 2011). Dies ist möglich, da der postnatale Reparaturprozess während der Frakturheilung gewisse Aspekte der embryonalen Skelettentwicklung rekapituliert. Einige der maßgeblichen Regulationsmechanismen, welche die enchondrale und intramembranöse Ossifikation während der fötalen Entwicklung steuern, spielen eine tragende Rolle im Verlauf der Frakturheilung. Sie unterscheiden sich dennoch in separaten Kontrollmechanismen und Schlüsselparametern, da einige Faktoren, die im Verlauf der Reparatur des Knochens eine Rolle spielen, während der Embryogenese nicht vorhanden sind (Bruder et al. 1994, Caplan 1987, Ferguson et al. 1998, Gerstenfeld et al. 2003).

Der Heilungsprozess einer Fraktur verläuft in mehreren Phasen, Abb. 6 stellt eine Übersicht über die Heilungsphasen dar. Zu Beginn entsteht durch äußere Einwirkung ein Trauma, der Knochen bricht (Phase 1). Die Phasen 2 bis 6 können zeitlich und räumlich nicht konkret voneinander getrennt werden, da sie teilweise parallel verlaufen, sie zeichnen sich jedoch durch jeweils spezifische zelluläre und molekulare Prozesse aus (Barnes et al. 1999, Schindeler et al. 2008).

Die Beschaffenheit des Bruches entscheidet darüber, welcher Heilungsprozess abläuft. Die meisten Frakturen heilen via indirekter bzw. sekundärer Frakturheilung, einer Kombination aus intramembranöser und enchondraler Ossifikation, die mit der Bildung eines Kallus einhergeht. Die direkte bzw. primäre Frakturheilung über den direkten Weg der intramembranösen Ossifikation ist selten, da sie eine nahezu lückenlose Verbindung der Knochenfragmente und nahezu komplette Stabilität verlangt (Dimitriou et al. 2005, Giannoudis et al. 2007).

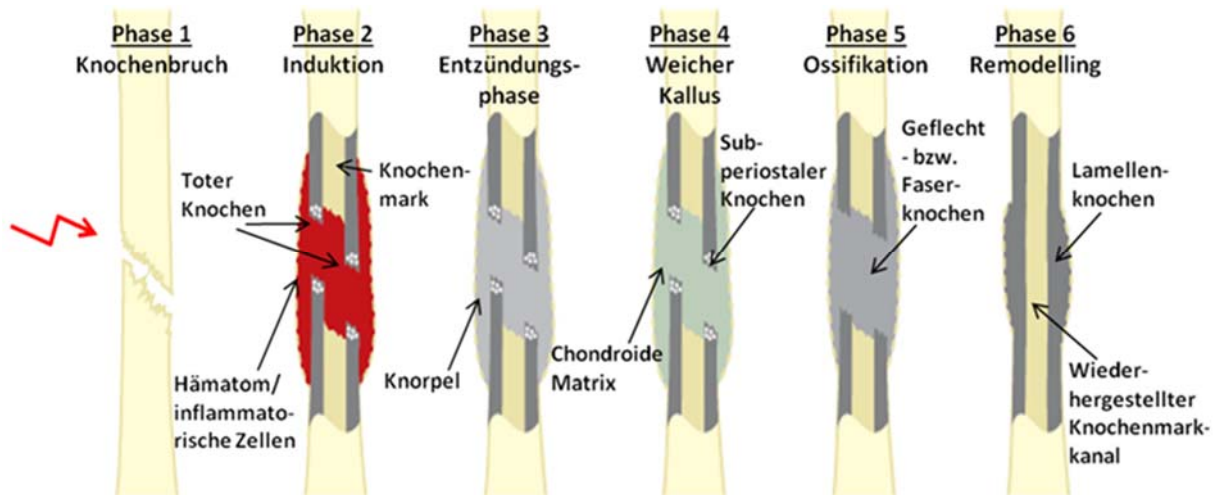


Abbildung 6: Phasen im Verlauf einer Frakturheilung. Ein initiales Trauma (Phase 1) führt zum Versagen des Knochens und es bildet sich ein Hämatom (Phase 2). Eine Vielzahl an Zelltypen wandert aus den umliegenden Geweben ein, wie zum Beispiel Immunzellen, die während der Entzündungsphase (Phase 3) Infektionen bekämpfen und mesenchymale Stammzellen anlocken. Aus letzteren differenzieren sich Chondrozyten, die knorpelige Matrix abgeben und so den weichen Kallus bilden (Phase 4), zum anderen differenzieren sie auch zu Osteoblasten, die damit beginnen, das Gewebe zu mineralisieren und dadurch einen harten, knöchernen Kallus aus Geflecht- bzw. Faserknochen bilden (Phase 5). Zuletzt (Phase 6) wird das vorhandene Gewebe abgebaut und durch ursprüngliches Knochengewebe, den Lamellenknochen, ersetzt.

1.2.1 Induktion und Entzündungsphase (Phase 2-3)

Durch eine Fraktur werden das umliegende Weichgewebe und die Blutgefäße zerstört, die normale Architektur im Knochenmarksraum geht verloren. Blutgefäße in der direkten Umgebung des Frakturspalts verschwinden und es entstehen Regionen mit hoher und niedriger Zelldichte (Brighton and Hunt 1991). Es bildet sich ein Hämatom, das als Quelle für Signalmoleküle wie Zytokine oder andere Faktoren dient. Diese bewirken eine Entzündungsreaktion und initiieren die Kaskade der zellulären Prozesse, die für eine erfolgreiche Heilung nötig sind. Mit der Bildung des Hämatoms wandern eine Vielzahl an Zellen wie z.B. Blutplättchen, Makrophagen, Fibroblasten und andere inflammatorische Zellen (z.B. Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) in die Umgebung der Fraktur ein. Diese geben wiederum pro-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren in das Gewebe ab, die als chemische Lockmittel wirken, um mesenchymale Stammzellen zu rekrutieren (Bolander 1992, Schindeler et al. 2008). Es gibt drei potentielle Quellen aus denen mesenchymale Stammzellen rekrutiert werden: das Periost, das Knochenmark und das umliegende Gewebe, aber auch aus der Zirkulation wandern mesenchymale Stammzellen in den Frakturspalt ein (Eghbali-Fatourehchi et al. 2005, Jaiswal et al. 1997, Katagiri et al. 1994, Malizos and Papatheodorou 2005, Nakahara et al. 1990, Rumi et al. 2005).

Eine zeitliche Analyse der Genexpression proinflammatorischer Zytokine zeigte, dass vor allem die Zytokine Interleukin-1 und -6 (IL-1 α , -1 β , -6) die Initiierung der proinflammatorischen Phase, die Rekrutierung von Zellen ins Hämatom und die Vaskularisierung des Gewebes beeinflussen. Das Expressionsmuster dieser Gene ist bimodal, während der ersten 24h der Entzündungsphase steigt die Expression an und normalisiert sich im Verlauf der proinflammatorischen Phase wieder. Später, während des *Remodellings*, steigt die Genexpression ein weiteres Mal an (Cho et al. 2002, Gerstenfeld et al. 2003, Kon et al. 2001). IL-1 β wird von Makrophagen und anderen inflammatorischen Zellen produziert und induziert die Expression von IL-6, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). Zudem fördert IL-1 β in hMSCs die Expression der MMPs-2 und -14 und erhöht dadurch deren Migrationsfähigkeit durch die Basalmembranen (Ries et al. 2007, Sfeir et al. 2005). IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches unter anderem von Monozyten, Chondrozyten, Fibroblasten und Osteoblasten produziert wird und die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten fördert. (Aarden et al. 1987, Heymann and Rousselle 2000, Lowik et al. 1989, Taguchi et al. 1998).

Im Mausmodell erreicht die proinflammatorische Phase der Frakturheilung nach ca. 24h ihren Höhepunkt und ist erst nach 7 Tagen vollständig abgeklungen. Die Zellen bilden während dieser Phase ein mesenchymales Kallusgewebe, welches vornehmlich aus Kollagen III besteht und in Mausmodellen bereits fünf Tage nach der Fraktur das größte Ausmaß erreicht (Cho et al. 2002, Hiltunen et al. 1993).

1.2.2 Der weiche Kallus (Phase 4)

Ein Schlüsselprozess der enchondralen Ossifikation im Verlauf der sekundären Frakturheilung ist die Bildung eines knorpeligen Softkallus als Template für die Mineralisierung, die Resorption und die nachfolgende Knochenbildung. Nach der initialen Rekrutierung beginnen die MSCs mit der Proliferation. Abhängig von den biomechanischen Konditionen differenzieren die MSCs im Bereich zwischen den Frakturrenden und nahe des Periosts zu proliferierenden und reifen Chondrozyten. Wie im Verlauf der enchondralen Ossifikation während der Embryogenese, synthetisieren sie eine spezifische Knorpelmatrix, den Softkallus bzw. weichen Kallus, der vornehmlich aus Kollagen II und Proteoglykanen besteht. Dieser dient zur Überbrückung des Frakturspalts und bietet eine mechanische Stabilität welche als Grundlage für den weiteren Heilungsprozess unabdingbar ist (Barnes et al. 1999, Dimitriou et al. 2005). Die Differenzierung des mesenchymalen Kallusgewebes zum knorpeligen Softkallus wird teils durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNos) geregelt. Sie wird bereits während der Entzündungsreaktion induziert und ist in der Lage große

Einleitung

Mengen an Stickstoffmonoxid (NO) zu produzieren. Eine Fehlfunktion der iNos führt zu reduzierten biomechanischen Eigenschaften, die sich auf die Kallusbildung auswirken (Zhu et al. 2001, Arasapam et al. 2006, Baldik et al. 2005). Zur gleichen Zeit beginnt subperiosteal, direkt angrenzend an die distalen und proximalen Enden der Fraktur bzw. des Kallus, der Prozess der intramembranösen Ossifikation. Osteoblasten aus dem Periost und MSCs, welche zu Osteoblasten differenzieren, beginnen eine knöchernen Matrix auszubilden. Mit dem Heilungsfortschritt wird dann von Osteoblasten zunehmend knöchernen Matrix in Richtung des Frakturspalts abgelagert (Marsell and Einhorn 2011).

Die ersten Anzeichen des knorpeligen Softkallus sind bereits 5 Tage nach der Fraktur im Mausmodell erkennbar und der Kallus erreicht ca. 8-9 Tage nach dem Trauma das Maximum an Fläche. Die vom Periost ausgehende intramembranöse Knochenbildung ist histologisch bereits in den ersten 7 - 10 Tagen erkennbar (Einhorn 1998, Hiltunen et al. 1993).

1.2.3 Die Phase der Kallus-Härtung/Ossifikation (Phase 5)

Der Übergang vom knorpeligen Softkallus zum Knochen verläuft im Prozess der enchondralen Ossifikation über ein hoch strukturiertes Programm wobei vorhandene Zellen ersetzt werden und die Matrix modifiziert (kalzifiziert) wird. Dieser Prozess ist in vielen Aspekten vergleichbar mit den Abläufen, die während der Embryogenese in der Wachstumsfuge geschehen. Die Proliferation der Chondrozyten im Softkallus-Gewebe verringert sich und sie beginnen zu hypertrophieren und Kollagen X in die knorpelige Matrix einzulagern. Zirka zwei Wochen nach der Fraktur im Mausmodell nehmen diese hypertrophen Chondrozyten den Großteil des knorpeligen Kallusgewebes ein (Einhorn 1998, Einhorn 2005). Zu Beginn der Kalzifizierung degradieren die hypertrophen Chondrozyten die Proteoglykan-reiche extrazelluläre Knorpelmatrix mit Hilfe von neutralen Proteasen, alkalischen Phosphatasen und MMPs und generieren so auch die zur Kalziumablagerung nötigen Phosphationen. Anschließend entlassen sie Matrix-Vesikel in die extrazelluläre Matrix, welche Kalziumphosphat-Komplexe enthalten und regeln so die zunehmende Kalzifizierung des Softkallus (Sfeir et al. 2005).

Blutgefäße wachsen nun durch Angiogenese aus der Umgebung in die kalzifizierte Knorpelmatrix ein. Zum einen über einen *vascular-endothelial growth factor* (VEGF)-abhängigen Weg, zum anderen könnte auch der Angiopietin-abhängige Signalweg eine Rolle spielen. Mit den Blutgefäßen wachsen auch neue Nervenfasern in das Gewebe ein (Street et al. 2002, Suri et al. 1996). Mit ihnen immigrieren MSCs und Monozyten in die kalzifizierte Knorpelmatrix. Monozyten differenzieren zu Osteoklasten, die die kalzifizierte Matrix resorbieren, und MSCs zu Osteoblasten, welche Osteoid

ablagern und dadurch den Geflecht- bzw. Faserknochen bilden. Der Prozess läuft solange ab, bis der gesamte knorpelige Softkallus durch den Geflecht- bzw. Faserknochen ersetzt wurde und dieser in Verbindung mit dem bereits durch intramembranöse Heilung gebildeten Faserknochen proximal und distal zu den Frakturrenden den „harten Kallus“ gebildet hat. Der Frakturspalt erhält durch den kalzifizierten Kallus eine größere mechanische Stabilität und die mechanischen Bedingungen, unter welchen Osteoblasten und Osteoklasten fähig sind durch intramembranöse Ossifikation die ursprüngliche Architektur des Knochens wiederherzustellen (Bolander 1992, Claes et al. 2012, Gerstenfeld et al. 2003). Tag 21 nach Fraktur ist repräsentativ für die primäre Bildung des Knochens, aber auch für das daran gekoppelte *Remodelling* der ECM (Wang et al. 2006).

Die Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten wird zu einem Teil durch Prostaglandine (PG) geregelt. PGs werden von der induzierbaren Isoform der Cyclooxygenase (Cox-2) gebildet und fördern die Osteogenese. Cox-2 ist nicht nur an der Regelung der intramembranösen Ossifikation beteiligt, sie beeinflusst auch die enchondrale Ossifikation, indem sie die chondrogene Differenzierung der MSCs moduliert. Studien mit Cox-2-defizienten Mäusen zeigten, dass die Kalzifizierung der Knorpelmatrix im Verlauf der Frakturheilung verzögert und die Osteoklastogenese reduziert war und dass keine primäre Knochenbildung festgestellt werden konnte (Huang et al. 2014, Zhang et al. 2002).

1.2.4 Die Wiederherstellung des ursprünglichen Knochens durch den geregelten Umbau der Knochenmatrix – das *Remodelling* (Phase 6)

Als Resultat periostealer, intramembranöser Knochenbildung und des Prozesses der enchondralen Ossifikation nimmt der Anteil an neu gebildetem Knochengewebe im Verlauf der Frakturheilung linear zu. Nach 28 Tagen hat das neu gebildete Faserknochengewebe vollständig den knorpeligen Kallus ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Frakturrenden durch den neu gebildeten Knochen bereits wieder vereint (Hiltunen et al. 1993). Nachdem der Frakturspalt durch die Bildung von neuem Knochen überbrückt wurde, beginnen Osteoklasten von außen her mit der Resorption des periostealen Kallus. Der Geflecht- bzw. Faserknochen im kortikalen Bereich der Frakturrenden wird dabei durch Lamellenknochen ersetzt. Das *Remodelling* und die Resorption führen zur Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenarchitektur und zur Ausbildung des Knochenmarkkanals. Das Endresultat ist komplett restaurierter, vollwertig mechanisch belastbarer Knochen (Claes et al. 2012). Die treibende Kraft in diesem Prozess ist eine elektrische Polarität. Diese entsteht, wenn auf die kristalline Umgebung der Knochenmatrix stetig wachsende Belastung bzw. Druck ausgeübt wird. Die Bildung des harten Kallus ermöglicht eine zunehmende axiale Belastung des frakturierten Knochens, was zur Entstehung elektropositiver konvexer Flächen und elektronegativer konkaver

Einleitung

Flächen führt und so Osteoklasten und Osteoblasten zum Umbau der Knochenmatrix aktiviert (Marsell and Einhorn 2011).

Die Resorption der ECM wird vor allem von MMPs durchgeführt. Durch die Regulation der Integrität und Zusammensetzung der ECM Struktur spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von Signalen, welche durch Matrixmoleküle übertragen werden und die an der Regulation der Zellproliferation, -differenzierung und dem Zelltod beteiligt sind (Stamenkovic 2003, Massova et al. 1998). Die Degradation von Knorpelgewebe wird besonders von MMP-3 beeinflusst, der Knochenumbau hingegen wird maßgeblich durch MMP-2 und -14 reguliert (Kevorkian et al. 2004, Lieu et al. 2011, Ohuchi et al. 1997). Die Veränderungen der ECM sind entscheidend für die Geweberegeneration und müssen deshalb adäquat kontrolliert werden. Die Aktivität der MMPs wird durch endogene Inhibitoren reguliert, den *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). Es gibt vier TIMPs (TIMP-1 bis -4), die in der Lage sind die bekannten MMPs zu inhibieren, jedoch mit unterschiedlichen Spezifitäten (Brew and Nagase 2010).

In Verbindung mit dem *Remodelling* steigt die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 wieder an. IL-1 β fördert die Proliferation, Differenzierung, Mineralisierung und das Überleben von Prä-Osteoblasten. Zudem reduziert IL-1 β über den NF κ B-vermittelten Signalweg die Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten und erhöht die Expression von Cox-2 (Lange et al. 2010, Murakami et al. 2000, Olmedo et al. 1999). IL-6 erhöht die Anzahl an Osteoklasten-Vorläuferzellen und aktiviert die Knochenresorption, indem es Zell-Zell-Interaktionen zwischen Osteoblasten und Osteoklasten stimuliert, zudem fördert IL-6 die Freisetzung von IL-1 β (de la Mata et al. 1995, Kurihara et al. 1990, Kwan Tat et al. 2004, Tamura et al. 1993). Die IL-6 vermittelten Effekte sind für einen korrekten Ablauf der *Remodelling* Phase sehr wichtig, eine fehlende Signalübertragung führte in IL-6-defizienten Mäusen zu verzögerter Matrix-Kalzifizierung und einer verminderten Osteoklasten-Dichte im Verlauf der Frakturheilung (Yang et al. 2007).

1.2.5 Einfluss biomechanischer Kräfte auf die Kallusbildung

Die Kallusbildung wird maßgeblich von den biomechanischen Kräften beeinflusst, die auf den Knochen und den Frakturspalt einwirken, diese sind Zug-, Scher- und Druckkräfte, sowie die interfragmentären Bewegungen der Frakturenenden. Nach Pauwels Theorie führen die zu Beginn der Frakturheilung vorherrschenden Zug- und Scherkräfte zur Bildung des fibrösen Bindegewebes während der Entzündungsphase. Zusätzliche Belastung durch hydrostatischen Druck bedingt schließlich die Bildung des knorpeligen Softkallus (Pauwels 1960). Claes und Kollegen konnten zeigen, dass die Größe der Kräfte und des Druckes ausschlaggebend für die Bildung des knorpeligen und

knöchernen Kallusgewebes ist und dadurch der Ablauf zwischen enchondraler und intramembranöser Ossifikation im Verlauf der Frakturheilung festgelegt wird. Intramembranöse Knochenbildung erfolgte nur unter geringen Zug- und Scherkräften und bei geringem hydrostatischem Druck, wohingegen hoher hydrostatischer Druck zur Bildung des knorpeligen Kallusgewebes durch Chondrozyten führte (Claes and Heigele 1999, Claes et al. 1998).

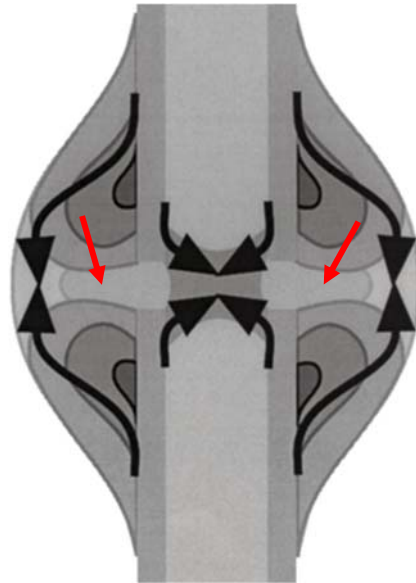


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kallusheilung bei flexibler Frakturstabilisierung. Die dunkelgrauen Bereiche stellen bereits verknöchertes Gewebe dar. Die schwarzen Pfeile zeigen den Verlauf der Kallusverknöcherung durch intramembranöse Ossifikation. Im Bereich zwischen den Frakturrenden (rote Pfeile) bildet sich der weiche Kallus, der die Frakturrenden stabilisiert, hydrostatischem Druck standhält und im Verlauf der Heilung durch die knöchernen Matrix ersetzt wird, modifiziert nach Claes and Heigele (1999).

Die Art der Frakturstabilisierung bestimmt den Grad der interfragmentären Bewegungen. Eine starre, solide Fixierung der Frakturrenden minimiert die Zug- und Scherkräfte, sowie den vorherrschenden hydrostatischen Druck und resultiert in einer geringen Kallusbildung. Unter diesen Bedingungen läuft der Heilungsprozess weniger über die enchondrale Ossifikation, sondern viel mehr über die intramembranöse Ossifikation ab (primäre Frakturheilung). Durch eine flexible Fixierung der Frakturen kommt es zur sekundären Frakturheilung. Es wirken stärkere Scherkräfte und ein höherer Druck auf die Umgebung des Frakturspalts und dies führt zur Bildung eines Softkallus durch enchondrale Ossifikation. Der Softkallus dient als stabilisierende Vorlage für die nachfolgende Verknöcherung der knorpeligen Matrix und die von den proximalen und distalen Enden zunehmende Verknöcherung durch intramembranöse Ossifikation (Abb. 7). Der Grad der Frakturstabilisierung beeinflusst jedoch nicht nur das Zusammenspiel von Osteogenese und Chondrogenese, sondern

bereits zu einem frühen Zeitpunkt auch die Immigrations-Kinetik von Makrophagen in die Umgebung der Fraktur (Claes and Heigele 1999, Hankemeier et al. 2001).

1.3 Innervierung des Knochens durch das sensible und sympathische Nervensystem

Nervenfasern des sympathischen und des sensiblen Nervensystems innervieren den Knochen nach dem Gesetz von Hilton: Nervenfasern aus den Muskeln und der Haut innervieren auch das Periost, die Knochenmatrix und das Knochenmark. Sie durchziehen die Knochenmatrix meist in Verbindung mit den Blutgefäßen ausgehend von den Epiphysen oder der Diaphyse. Nervenfasern, welche in die Knochenmatrix und den Knochenmarksraum vordringen sind meist sympathischen, vasomotorischen Ursprungs, doch auch sensible Nervenfasern sind vorhanden. Die Dichte an sensiblen Nervenfasern im Periost übersteigt sogar die Zahl an sympathischen Nervenfasern (Elefteriou et al. 2014). Sympathische Nervenfasern vermitteln ihre Effekte über sympathische Neurotransmitter wie Neuropeptid Y (NPY) und Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), aber vor allem auch durch Katecholamine wie Noradrenalin (NA). Sympathische Nervenfasern enthalten die Enzyme Tyrosin-Hydroxylase (TH) und Dopamin β -Hydroxylase (DBH) welche an wichtigen Schritten in der Synthese der Katecholamine beteiligt sind (Abb. 9). Sensible Nervenfasern sind sensitiv gegenüber mechanischen, thermischen und chemischen Reizen und übertragen diese im Allgemeinen über zwei nocizeptive Neuropeptid-Familien: Calcitonin-gene related peptide (CGRP) und Tachykinine wie Substanz P (SP). Durch die aktive Expression neuronaler Transmitter, die in die Peripherie abgegeben werden, sind die Nervenfasern in der Lage die benachbarten Knochenzellen und somit die Knochenhomöostase zu modulieren. Die vom sympathischen Nervensystem als Neurotransmitter verwendeten Katecholamine und die vom sensiblen Nervensystem verwendeten Neuropeptide CGRP und SP gehören zu den Faktoren, welche die metabolischen Aktivitäten des Knochens und somit auch die anabolen Aktivitäten während der Geweberegeneration steuern können (Elefteriou et al. 2014, Grassel 2014, Imai and Matsusue 2002). Die Zellen im Knochen exprimieren die geeigneten Rezeptoren für diese neuronalen Mediatoren und die Aktivierung dieser Rezeptoren beeinflusst sowohl die Aktivität der Knochen-bildenden Osteoblasten als auch der Knochen-resorbierenden Osteoklasten. Diese neuro-osteogenen Interaktionen spielen nicht nur während der Skelettentwicklung und der alltäglichen Knochenhomöostase eine Rolle sondern auch bei der Reparatur des Knochens nach einem Trauma (Grassel 2014).

1.3.1 Der Einfluss des sensiblen und sympathischen Nervensystems auf die Frakturheilung

Eine beachtliche Anzahl an Studien zeigte bis dato, dass das Nervensystem nicht nur Einfluss auf den Knochenmetabolismus, sondern auch auf die Frakturheilung ausübt. In querschnittsgelähmten Kindern und Patienten mit Rückenmarksverletzungen wurden eine erhöhte Fraktur-Rate und eine exzessive Kallusbildung festgestellt (Jones et al. 2004, Lerner 2002). In Patienten mit schweren Kopfverletzungen wurde nach einer Fraktur ein atypischer Heilungsprozess mit extremer Kallusbildung festgestellt, der direkt oder indirekt durch die Kopfverletzung bedingt wurde (Spencer 1987, Perkins and Skirving 1987). Analysen des Frakturheilungsprozesses nach Resektion des Ischiasnerves in Ratten bestätigten die in Patienten beobachtete übermäßige Kallusbildung (Nordsletten et al. 1994, Madsen et al. 1998). Es gibt jedoch auch kontroverse Studien, Aro et al. beschrieben, dass sich in denervierten, frakturierten Beinen ein kleinerer Kallus gebildet hatte, der eine geringere Gewebedichte aufwies und weniger Kollagene und Mineralien (Kalzium, Phosphat) in der Matrix enthielt (Aro 1985). Den Studien liegen verschiedene Fraktur- und Stabilisierungsmethoden zu Grunde, die möglicherweise zu den unterschiedlichen Ergebnissen führten, zudem wurde durch die Durchtrennung der ipsilateralen Nervenfasern der gesamte neuronale Einfluss verändert, die Wirkung der einzelnen neuronalen Transmitter kann daher nicht ermittelt werden. Sie zeigen jedoch deutlich, dass der Reparaturmechanismus nach einem Trauma durch das Nervensystem modifiziert werden kann.

Die durch eine Fraktur zerstörten Nervenfasern zeigen schon 3 Tage nach Fraktur regenerative Aktivität. Während der Entzündungsphase penetrieren regenerierende und reife Nervenfasern bereits vor der Neovaskularisierung das fibröse Kallusgewebe zwischen den Frakturrenden, sowie das Hämatom und das Periost, was auf eine aktive Beteiligung der peripheren Nervenfasern an der Gewebereparatur schließen lässt. Der knorpelige Softkallus bleibt avaskulär, er wird weder von Blutgefäßen noch von Nervenfasern durchzogen. Im Periost existieren jedoch weiterhin Nervenfasern und innervieren den bereits neu gebildeten Faserknochen. Über die freien Nervenenden entlassen sie neuronale Mediatoren in die Peripherie, deren Funktionen viele Prozesse wie die Angiogenese oder den Knochenumbau während der Geweberegeneration beeinflussen. Die Wiederherstellung eines intakten Nervensystems scheint daher essentiell zu sein für einen erfolgreichen Heilungsprozess (Hukkanen et al. 1993, Li et al. 2001).

1.3.2 Substanz P - Neurotransmitter des sensiblen Nervensystems

Substanz P (SP) ist ein bedeutender Neurotransmitter, der in vielen Nervenfasern des sensiblen Nervensystems enthalten ist. SP-enhaltende Nervenfasern wurden im Periost, im Knochen und im

Einleitung

Knochenmarksraum in Verbindung mit Blutgefäßen nachgewiesen. Viele von diesen reichen von den Blutgefäßen aus als freie Nervenenden bis in den Knochenmarkskanal, was darauf hinweist, dass SP außer den vasomotorischen noch weitere efferente Effekte ausübt (Bjurholm et al. 1988b, Imai and Matsusue 2002). SP besteht aus 11 Aminosäuren (Abb. 8 B) und gehört zur Neuropeptid Familie der Tachykinine. Es wird zusammen mit Neurokinin A (NKA), Neuropeptid K (NPK) und Neuropeptid γ (NP γ) durch das Prä-Protachykinin-A Gen (PPT-A/*Tac1 gene*) kodiert. Durch alternatives Spleißen der RNA des PPT-A Gens entstehen drei mRNAs (Abb. 8 A) mit unterschiedlichen Verteilungsmustern im peripheren und zentralen Nervensystem (PNS, ZNS). Entgegen der Neuropeptide NKA, NPK und NP γ kann SP von jeder dieser mRNAs translatiert werden (Harrison and Geppetti 2001, Severini et al. 2002). Es gibt drei Tachykinin Rezeptoren, über die Tachykinine ihre Effekte vermitteln, die Neurokinin Rezeptoren NK₁, NK₂ und NK₃ (NK1R, NK2R, NK3R). Sie gehören zur Familie der Rhodopsin-ähnlichen, G α -Protein gekoppelten Rezeptoren, die sich durch 7 Transmembran-Domänen auszeichnen. Jeder von ihnen kann von den bekannten Tachykininen gebunden werden, jedoch mit unterschiedlich hoher Präferenz. SP besitzt die höchste Affinität für den NK1R (Pennefather et al. 2004). Studien mit Hamster- und Rattenzellen, die mit dem NK1R transfiziert wurden, zeigten, dass SP in der Lage ist unterschiedliche Signalwege zu aktivieren (Abb. 8 C) (Steinhoff et al. 2014).

In der Peripherie bewirken SP und auch die anderen Tachykinine vornehmlich eine "neurogene Inflammation", zu den Effekten zählen unter anderen die Vasodilatation der Arteriolen, Plasmaextravasation, Leukozyten-Adhäsion auf den Endothelzellen der Venolen sowie ionotrope und chronotrope Effekte auf das Herz. SP ist daher maßgeblich an der Übertragung moderater bis intensiver thermaler, mechanischer und chemischer Schmerz-Stimuli sowie am Ablauf von Entzündungsreaktionen beteiligt (Cao et al. 1998, Harrison and Geppetti 2001).

Die Konzentrationen, in denen SP im Gewebe vorhanden ist, unterscheiden sich zwischen den unterschiedlichen Gewebearten. In Femurknochen von Ratten konnte eine SP-Konzentration von $0,06 \pm 0,02$ Pikomol (pmol) pro Gramm (g) Gewebe festgestellt werden, im Periost konnte SP in einer Konzentration von $0,57 \pm 0,15$ pmol/g detektiert werden. Eine hohe Konzentration von SP konnte im Knochenmark gefunden werden, hier wurden $2,39 \pm 0,6$ pmol/g SP gemessen (Ahmed et al. 1994). In den Sprunggelenken von Ratten konnte SP in einer Konzentration von $0,455 \pm 0,025$ pmol/g gemessen werden, in den dorsalen Wurzelganglions konnten im Mittel $3,795 \pm 0,085$ pmol/g SP detektiert werden (Ahmed et al. 1995). Opolka et al. quantifizierten die Menge an SP, welche in vitro von Chondrozyten in Pelletkulturen produziert und in das Medium abgegeben wurde. Im Überstand von Pelletkulturen aus 2×10^4 Chondrozyten konnten sie 528 pg SP messen (Opolka et al. 2012).

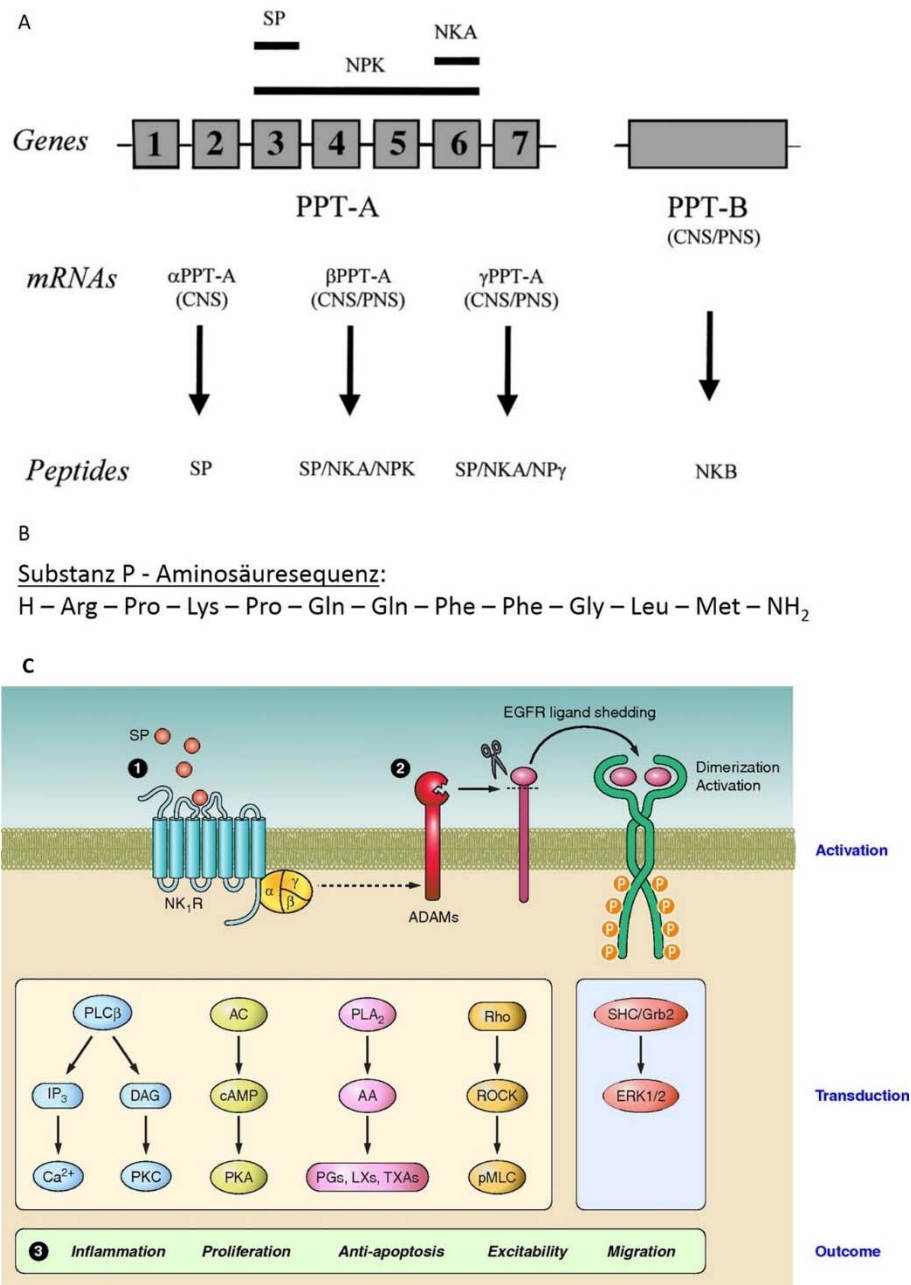


Abbildung 8: Biosynthese von Substanz P und dessen Signaltransduktion via NK1R (A) Schematische Darstellung der Biosynthese von SP, NKA, NPK und NPY (B) Aminosäuresequenz von SP (C) Signaltransduktion von SP via NK1R; ADAMs = A Disintegrin and Metalloproteinase; EGFR = Epidermal growth factor receptor; PLC β = Phospholipase C beta; IP₃ = Inositoltrisphosphat; DAG = Diacylglycerin; Ca²⁺ = Kalzium; PKC = Proteinkinase C; AC = Adenylylcyclase; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; PKA = Proteinkinase A; PLA₂ = Phospholipase A₂; AA = Arachidonsäure; PGs = Prostaglandine; LXs = Leukotriene; TXAs = Thromboxan-A₂; Rho = Ras homologue-GTPasen; ROCK = Rho-assoziierte Proteinkinase; pMLC = phosphorylierte Myosin regulatory light chain; SHC = SHC-transforming protein 1; Grb2 = Growth factor receptor-bound protein 2; ERK = Extracellular-signal regulated kinase (Harrison and Geppetti 2001, Steinhoff et al. 2014).

Der Einfluss von SP und dem NK1R auf Zellen des muskuloskelettalen Systems wurde in zahlreichen Studien beschrieben. Über den NK1R, der von Knochenmarks-Makrophagen und Osteoklasten

Einleitung

exprimiert wird, reguliert SP das *Remodelling* der Knochenmatrix (Goto et al. 1998, Mori et al. 1999a, Wang et al. 2009). Zudem wurde gezeigt, dass SP durch die Aktivierung des NK1R auf Osteoblasten-Vorläuferzellen und Osteoblasten die Knochenbildung stimulieren kann (Goto et al. 2007, Shih and Bernard 1997). Auch in Chondrozyten konnte die Expression des NK1R und die Produktion von SP nachgewiesen werden. Dabei induzierte SP dosisabhängig die Bildung von fokalen Adhäsionen und förderte die Zellproliferation der Chondrozyten (Opolka et al. 2012). Der Einfluss auf die Zellproliferation konnte auch für Osteoblasten, MSCs aus dem Knochenmark, synoviale Fibroblasten und T- und B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Liu et al. 2007, Nilsson et al. 1985).

Ebenso gibt es deutliche Hinweise auf den Einfluss von SP und NK1R auf die Knochenhomöostase und die Frakturheilung *in vivo*. Studien über das „komplexe regionale Schmerzsyndrom“ (*complex regional pain syndrom/CRPS*) zeigten, dass SP eine Rolle während den Heilungsprozessen einer Fraktur spielt. Nervenschädigungen, oft in Zusammenhang mit einer Fraktur, führen zu vaskulären, nozizeptiven und den Knochen betreffenden Veränderungen. An der Entstehung der Spätschäden des CRPS ist die Signalübertragung via SP und dessen Rezeptor NK1 beteiligt, da eine Blockierung des NK1R die Symptome reduzierte (Guo et al. 2004, Kingery et al. 2003). In Verbindung mit dem Verlust der Knochenqualität nach Ovariectomie und der daraus resultierenden schlechteren Frakturheilung wurde *in vivo* eine reduzierte Menge an Substanz P festgestellt, was den aktiven Einfluss des sensiblen Nervensystems auf die Knochenhomöostase verdeutlicht (Ding et al. 2010). Die mechanischen Kräfte die auf den Frakturkallus einwirken, scheinen in Zusammenhang mit dem Auftreten von SP zu stehen. SP überträgt die durch mechanische Belastung vermittelten Effekte auf die Zellen. Während der Knochenregeneration fördert SP die Knochenbildung, wohingegen eine zunehmende Anzahl an SP-positiven Nervenfasern in unbelasteten Bereichen des Frakturkallus während der *Remodelling* Phase die Knochenresorption erhöht (Li et al. 2010).

SP ist also in der Lage den Metabolismus der Zellen, die am Heilungsprozess einer Fraktur beteiligt sind, zu modulieren.

1.3.3 Das sympathische Nervensystem und seine Neurotransmitter

Das sympathische Nervensystem (SNS) vermittelt seine Effekte über Katecholamine. Zu diesen zählen unter anderem Noradrenalin (NA) und Adrenalin. Adrenalin wirkt vorrangig als Hormon, und wird vom Nebennierenmark produziert. Noradrenalin wirkt meist als Neurotransmitter, der von den sympathischen Nervenfasern (SNFs) in die Peripherie entlassen wird und die Effekte des SNS auf postsynaptische Zellen überträgt. Ausgehend von L-Tyrosin werden sie mit Hilfe von Enzymen in mehreren Schritten synthetisiert, das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) vermittelt dabei den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Synthese (Abb. 9) (Molinoff and Axelrod 1971).

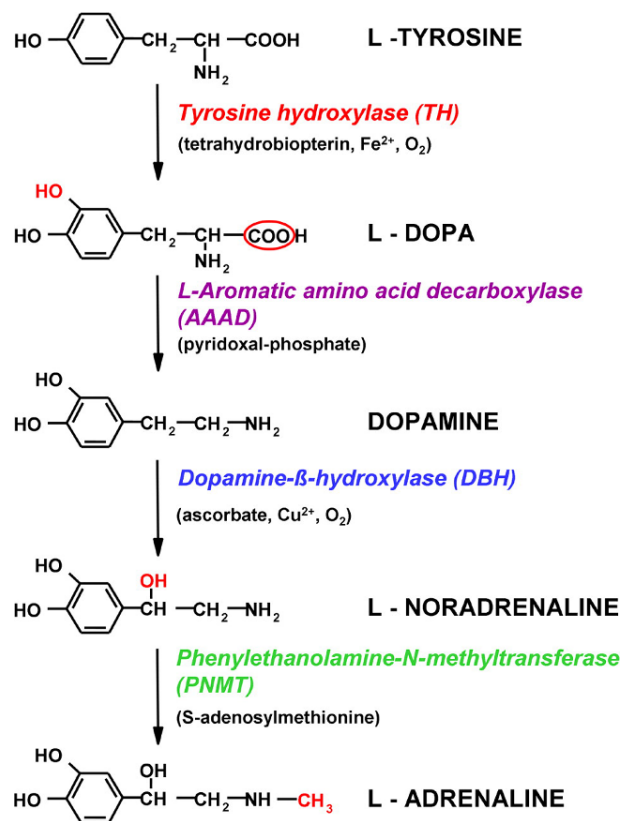


Abbildung 9: Biosynthese der Katecholamine mit den enzymatischen Schritten. Die Umwandlung von L-Tyrosin zu L-Noradrenalin ist typisch für sympathische Nervenfasern und Neuronen im Gehirn, die Umsetzung von L-Noradrenalin zu L-Adrenalin ist typisch für das Nebennierenmark und einigen peripheren Neuronen sowie einigen Neuronen im Gehirn (Kvetnansky et al. 2009).

Adrenerge Rezeptoren (Adrenozeptoren/AR) aus der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren vermitteln die Effekte der Katecholamine. Es existieren alpha- und beta-AR, die jeweils in Subtypen unterteilt werden können und ihre Signale über unterschiedliche "second messenger" Systeme weiterleiten: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 und β_3 (Adra1, Adra2, Adrb1-3) (Barnes 1995, Bylund 1992). α_1 -AR aktivieren über das G_q -Protein den Signalweg über die Phospholipase C, woraufhin Diacylglycerine und Inositol (1,4,5)-triphosphat gebildet werden, die Signalübertragung via α_2 -AR inhibiert über das G_i -Protein die Adenylatzyklase und unterdrückt die Bildung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Die Stimulation der β -AR über das G_s -Potein bewirkt eine Aktivierung der Adenylatzyklase, was zur Produktion von cAMP führt (Raymond et al. 1990, Takarada et al. 2009).

Mehrere Studien zeigten bereits den Einfluss des SNS auf Zellen des muskuloskelettalen Systems. Auf Osteoblasten konnte die Präsenz von α_{1B} -, α_{1D} -, α_{2A} - und β_2 -AR nachgewiesen werden. Über die Aktivierung des α_1 -AR durch den Neurotransmitter NA erhöht das SNS die Proliferationsrate der Osteoblasten, die Stimulation des β_2 -AR hingegen inhibiert deren Proliferation *in vitro* (Huang et al.

Einleitung

2009a, Nishiura and Abe 2007, Togari 2002b). Zudem beeinflusst das SNS in Osteoblasten die Produktion von RANKL und Osteoprotegerin (OPG) via α - und β -AR und ist dadurch in der Lage die Osteoklastogenese und die Knochenresorption zu modulieren (Aitken et al. 2009, Takeuchi et al. 2001). Die Expression von AR auf Osteoklasten ermöglicht dem SNS auch direkt Einfluss auf die Knochenresorption zu nehmen, ohne den Signalweg über Osteoblasten zu nutzen. Durch Expressionsanalysen konnten die AR α 1B, α 2B und β 2 auf Osteoklasten nachgewiesen werden. Sympathische Nervenfasern können Osteoklasten dadurch direkt aktivieren und steuern sowohl die Transkription Osteoklasten-spezifischer Gene wie Kathepsin K oder TRAP, als auch die Resorptionsaktivität über die Stimulation mittels Noradrenalin (Arai et al. 2003b, Kondo et al. 2013, Suga et al. 2010b). Chondrozyten exprimieren ebenfalls AR. In Tibia-Explantatkulturen konnte der β 2-AR in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten detektiert werden; die Expression des α 2A-AR war eingeschränkt auf prä- und hypertrophe Chondrozyten. In vitro Analysen von 3D-Pelletkulturen aus isolierten Chondrozyten bestätigten die Expression der AR β 2 und α 2A, außerdem konnten sie zusätzlich die Expression der AR α 1B, α 1D, α 2B, α 2C sowie β 1 und β 3 nachweisen. Eine Stimulation der AR durch Katecholamine moduliert die Chondrogenese und beeinflusst die Apoptoserate der Chondrozyten sowie die Bildung fokaler Adhäsionen (Opolka et al. 2012, Takarada et al. 2009).

Der Einfluss des SNS auf die Knochenhomöostase und auf die Frakturheilung *in vivo* wird in mehreren Studien verdeutlicht. Studien mit *Adrb2*^{-/-} Mäusen zeigten, dass das SNS ein negativer Regulator der Knochenbildung ist. Ausgehend von einem Regulationsmechanismus des zentralen Nervensystems ist das SNS notwendig um die Knochenbildung und die Knochenresorption zu regulieren. Es wirkt dabei weitgehend über die Modulation der Osteoblasten-Funktion, indem es die Expression Osteoklastogenese-fördernder Faktoren wie z.B. RANKL regelt (Amling et al. 2000, Ducy et al. 2000, Elefteriou et al. 2005, Takeda et al. 2002). Eine verringerte Knochenqualität nach verminderter Belastung konnte auf eine Reduktion der Osteoblasten-Aktivität, die durch das SNS vermittelt wurde, zurückgeführt werden (Kondo et al. 2005). Einige Studien beschäftigten sich bereits mit dem Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die Frakturheilung. Die Verwendung von β -Blockern reduzierte das Frakturrisiko und lässt einen positiven Einfluss auf die Knochenqualität vermuten. Die Applikation von nicht-selektiven β -Blockern erhöhte bei Ratten die Rate der enchondralen Ossifikation im Verlauf des Heilungsprozesses sowie die Knochenstabilität (Minkowitz et al. 1991). Auch in Patienten mit Unfall-bedingten Hüftfrakturen und Frakturen auf Grund verringerter Knochendichte konnte der positive Effekt der beta-Blocker auf die Knochenmatrix durch Verminderung des Frakturrisikos festgestellt werden. Es gibt aber auch einige kontroverse Studien,

welche keinen positiven Einfluss auf die Knochendichte und das Frakturrisiko feststellen konnten (de Vries et al. 2007, Perez-Castrillon et al. 2007, Schlienger et al. 2004, Wiens et al. 2006).

Das SNS ist in der Lage die Knochenhomöostase und die Frakturheilung zu beeinflussen, jedoch sind die genauen Mechanismen, wie die verschiedenen sympathischen Neurotransmitter auf osteogene und chondrogene Zellen wirken, weitgehend unbekannt.

2. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des vom BMBF geförderten Projekts „*Neuroimmune connections in inflammation and pain*“ durchgeführt (AZ: 01EC1004D).

Nervenfasern des sensiblen und sympathischen Nervensystems innervieren den Knochen und ebenso den Frakturkallus nach einem Trauma. Sie spielen eine wichtige Rolle im Verlauf der Frakturheilung, denn Schädigungen des Nervensystems beeinflussen den Heilungsprozess und führen zu Pseudoarthrosen. Die Frakturheilung im adulten Organismus rekapituliert die enchondrale Ossifikation im Verlauf der embryonalen Skelettentwicklung und ist demnach ein ideales System, um Fragen über die skelettale Geweberegeneration und deren Remodelling zu analysieren. Über Neurotransmitter, die von Nervenfasern in die Peripherie abgegeben werden, ist das Nervensystem in der Lage Prozesse wie Zellproliferation, -differenzierung und den Matrixumbau zu modulieren. Sensible Substanz P (SP)-positive Nervenfasern befinden sich im Periost und im Knochenmark, das Vorhandensein von SP wurde im artikulären Knorpel nachgewiesen, wo es an der Mechanotransduktion der Chondrozyten beteiligt ist. Sympathische Nervenfasern innervieren den Frakturkallus in der frühen Heilungsphase und ziehen sich dann ins Periost zurück. Studien konnten bereits den Einfluss von SP und dem sympathischen Nervensystem auf Kallus-bildende Zellen *in vitro* nachweisen. Die molekularen Effekte der neuronalen Mediatoren des sensiblen und sympathischen Nervensystems auf die Kallusreifung, ein Prozess im adulten Organismus welcher der enchondralen Ossifikation während des embryonalen Längenwachstums gleicht, sind jedoch weitgehend unbekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte des sensiblen Neurotransmitters Substanz P und der Katecholamine, den Neurotransmittern des sympathischen Nervensystems, auf den Prozess der enchondralen Ossifikation im Verlauf der Kallusreifung an Hand eines murinen Frakturmodells zu analysieren. Mit Hilfe von SP-defizienten Mäusen und Mäusen, in denen das sympathische Nervensystem chemisch inhibiert wurde, sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Sind Chondrozyten im Frakturkallus in der Lage durch die Expression geeigneter Rezeptoren auf Stimuli sensibler bzw. sympathischer Nervenfasern zu reagieren (*in vivo*)?
- Welchen Einfluss hat das Fehlen des sensiblen Neurotransmitters SP und die chemische Inhibierung des sympathischen Nervensystems *in vivo* auf die Matrixbildung und -zusammensetzung während der skelettalen Regeneration nach einem Trauma?
- Wie beeinflusst das Fehlen von SP und die chemische Sympathektomie *in vivo* die Zelldifferenzierung? Wird die hypertrophe Differenzierung der Knorpel-bildenden

Chondrozyten gehemmt oder gefördert? Wird die Differenzierung und Aktivität Knochenbildender und Knochen-resorbierender Zellen moduliert?

- Beeinflusst das Fehlen von SP und die Inhibierung des sympathischen Nervensystems die Expression von Genen, die die Matrixbildung und die Entzündungsreaktion steuern?
- Verändert das Fehlen von SP bzw. die chemische Sympathektomie die initiale Entzündungsphase *in vivo* (Readout Parameter: Schmerzempfinden)?
- Welchen Einfluss haben das Fehlen von SP und die Inhibierung des sympathischen Nervensystems auf die Entwicklung des während der Fraktur neu gebildeten Knochens und des bereits bestehenden Knochens bezüglich der strukturellen Mikroarchitektur und der mechanischen Eigenschaften?

Um den Verlauf der enchondralen Ossifikation im adulten Organismus zu untersuchen, wurden zwei experimentell unterschiedlich anspruchsvolle Frakturmodelle verwendet. Zum einen wurden - experimentell einfach durchzuführen - unstabilisierte Tibiafrakturen generiert, diese ermöglichen auf Grund einer deutlichen Kallusbildung die *in vitro* Kultivierung des Kallus als Explantat sowie immunhistologische, histochemische und morphometrische Analysen des Kallusdifferenzierungsverlaufs. Zum anderen wurden - um einheitlichere Kallusgrößen zu erhalten - die experimentell deutlich aufwändigeren, flexibel stabilisierten Femurfrakturen gesetzt, welche für die biomechanischen Tests und die μ Ct-Analysen verwendet wurden.

Die Bearbeitung der aufgeführten Fragen soll genauere Kenntnis über den Einfluss des sensiblen, SP-positiven- und sympathischen Nervensystems auf die molekularen Vorgänge der Kallusreifung im Verlauf der Frakturheilung liefern. Ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen der Kallusdifferenzierung ist auch klinisch relevant, da dies zu möglichen neuen Therapie-Ansätzen für nicht-verheilte Frakturen (Pseudarthrosen) führen kann.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Propanol, ROTIPURAN [®]	Nr.: 6752.4, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	RNA Isolierung
4', 6'-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland	Immunfluoreszenzfärbungen, Kernfärbungen
Alzianblau-Färbelösung	Nr.: A5268, Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland	1% in 3%iger Essigsäurelösung, pH 2,5 Histologie
Chloroform	Nr.: 102445, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	RNA-Isolierung
Dithiothreitol (DTT)	Nr.: A1101, AppliChem GMBH, Darmstadt, Deutschland	Reaktionspuffer – Kathepsin K Assay 0,1 mM
di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Nr.: 1.06580, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	200mM im PBS
Eisen III Chlorid	Nr.: F7134, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Weigert's Hämatoxylin, Lösung B 1,5% in H ₂ O
Essigsäure, 100%	Nr.: 6755.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	3% Histologische Färbelösung/Alzian blau
Ethanol	Nr.: 5054.4, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	RNA-Isolierung, 75% EtOH

Ethanol	Chemikalienausgabe, Universität Regensburg	Histologische Färbungen, 100%, 96%, 70%, 50% EtOH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Nr.: X986.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Paraffinpräparate, Entkalkung mit 20% EDTA, pH 7,3 Reaktionspuffer – Kathepsin K Assay, 1 mM
Fetal Bovine Serum (FBS)	Nr.: F7524, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Zusatz zum Medium, 10%
Hyaluronidase	Nr.: H3506, Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland	Immunfluoreszenzfärbungen, 0,1%, bei 37°C für 90 Min zur Epitopdemaskierung
Hämatoxylin	Nr.: 1043020100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Weigert´s Hämatoxylin, Lösung A 1% in 96% EtOH
Iodessigsäure	Nr.: A2097, AppliChem GMBH, Darmstadt, Deutschland	Stopp-Puffer – Kathepsin K Assay 0,1 M
Kaliumchlorid (KCl)	Nr.: 1.04936, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	54 mM im PBS
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Nr.: 1.04873, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	36 mM im PBS
Ketamin 10%	Garbsen, Deutschland	Narkotikum, 90 - 120 mg/kg KG
Kollagenase Typ II	Nr.: LS004174, Code: CLS-2, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NY, USA	Kollagenase Typ II-Lösung, 330 Units/mg, 5.3mg/ml PBS, Osteoblasten-Isolierung
Natriumacetat	Nr.: 6673.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland	Reaktionspuffer – Kathepsin K Assay 0,1 M

Material und Methoden

Natriumchlorid (NaCl)	Nr.: 3957.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	2,8M im PBS
Normal goat serum (NGS)	Nr.: G9023, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Immunfluoreszenzfärbungen, 10%, 1%
Paraformaldehyd	Nr.: A3813, AppliChem GMBH, Darmstadt, Deutschland	Paraffinpräparate/Paraffineinbettung, 4%
peqGOLD TriFAST™	Nr.: 30-2030, peqlab, Erlangen, Deutschland	RNA Isolierung
Pikrinsäure	Nr.: 80450 FLUKA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Gesättigte, wässrige Lösung, 1,2% w/v, pH 2,0 Histologie
Propanol 70%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Desinfektion
Protease XXIV	Nr.: P8038, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Immunfluoreszenzfärbungen, 0,05% bei 37°C für 10 Min zur Epitopdemaskierung
Roti® Histokitt	Nr.: 6638.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Roti® Histol	Nr.: 6640.4, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie und Immunfluoreszenz
Salzsäure (HCl) 37%	Nr.: A0659, AppliChem GMBH, Darmstadt, Deutschland	0,01 M Histologie
Siriusrot F3B	Nr.: 1A-280, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland	0,1% in gesättigter wässriger Lösung mit 1,2% Pikrinsäure Histologie
Temgesic (Buprenorphin Hydrochlorid)	Essex Pharma GmbH, München, Deutschland	Schmerzmittel, 0,1 µg/g KG

Triton X-100	T8787, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Zytotoxizitätsbestimmung (LDH Assay), 1:5
Trypsin/EDTA (10x)	Nr.: T4174, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	1x konzentriert
Wasserstoffperoxid 30%	Nr.: 8070, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie und Immunfluoreszenz, 3%
Xylazin 2%	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland	Narkotikum, 6-8 mg/kg KG

3.1.2 Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), High glucose (4,5g/l)	Nr.: 11971-025, Gibco® , Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	Kallusexplantate
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1g/l)	Nr.: 31885-023, Gibco® , Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	Knochenexplantate
Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification (MEM)	Nr.: M4526, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Osteoklasten-Zellkultur
Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification with RNA/DNA (MEM)	Nr.: M8042, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Osteoblasten-Zellkultur

3.1.3 Zusätze – Zellkultur

6-Hydroxydopamine hydrobromide (6-OHDA)	Nr.: H6507, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	80 mg/kg KG, chemische Sympathektomie
β-Glycerophosphat	Nr.: G9422, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	10 mM, (Osteoblasten)

Material und Methoden

Antibiotic Antimycotic Solution (100x)	Nr.: A5955, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	1% Zusatz zum Medium
Ascorbatsäure-2-Phosphat	Nr.: A8960, Sigma, Saint Louis, MO, USA	50 µg/ml (Kallusexplantate) 100 µM (Osteoblasten/Osteoklasten)
Dexamethason	Nr.: D4902, Sigma, Saint Louis, MO, USA	0,05 µM (Kallusexplantate) 0,1 µM (Osteoblasten/Osteoklasten)
GlutaMAX™-I (100x) Supplement	Nr.: 35050-038, Gibco®, Life Technologies, Paisley, UK	2% (Osteoklasten) 4 mM (Osteoblasten)
Interleukin-1β (IL-1β)	Nr.: 211-11B, PeproTech, Hamburg, Deutschland	Stimulation der Explantatkulturen, 0,5 µg/ml Medium
IST+premix	ITS+premix, Nr.: 354352, BD Biosciences, Bedford, MA, USA	Insulin 6,25 µg/ml Transferrin 6,25 µg/ml Selensäure 6,25ng/ml BSA 1,25 mg/ml Linolensäure 5,35 µg/ml, Kallusexplantate, Verdünnung 1:100
Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)	Nr.: 315-02, PeproTech, Hamburg, Deutschland	20ng/ml (BMMs/Osteoklasten)
Noradrenalin	Nr.: N5785, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Stimulation der Explantatkulturen, 10 ⁻⁶ M bzw. 10 ⁻⁸ M
Prolin (L-Proline)	Nr.: P-5607, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	40 µg/ml (Kallusexplantate)
Pyruvat (Sodium Pyruvate)	Nr.: S8636, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	110 µg/ml (Explantatkulturen)
Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL)	Nr.: 462-TR, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	50 ng/ml (Osteoklasten)

Substanz P (SP)	Nr.: S6883, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Stimulation der Explantatkulturen, 10^{-8} M bzw. 10^{-10} M
Transforming growth factor β (TGF- β)	Nr.:100-36E, PeproTech, Hamburg, Deutschland	5 ng/ml (Kallusexplantate)

3.1.4 Puffer

Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS)	Nr.: D8537, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Zellkultur, KCL 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ (anhyd) 0,2 g/l NaCl 8,0 g/l Na ₂ HPO ₄ 1,15 g/l
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Aus einzelnen Reagenzien angesetzt	Histologische Färbungen, 2,8M NaCl 54 mM KCl, 200 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 36 mM KH ₂ PO ₄ Gelöst in Aqua dest. pH 7,2
Reaktionspuffer – Kathepsin K Assay	Aus einzelnen Reagenzien angesetzt	0,1 M Natriumacetat 1 mM EDTA 0,1 mM DTT pH 5,5
Stopp-Puffer – Kathepsin K Assay	Aus einzelnen Reagenzien angesetzt	0,1 M Tris 0,1M Iodessigsäure pH 8

3.1.5 Kits

<i>Absolutely RNA Nanoprep Kit</i>	Nr.: 400753, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland	RNA Aufreinigung, DNase Verdau
<i>Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit</i>	Nr.: 387A-1KT, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	TRAP-Färbung zur Osteoklastenidentifizierung

Material und Methoden

<i>AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit</i>	Stratagene, La Jolla, USA	cDNA Herstellung
<i>Agilent RNA 6000 Nano Kit</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland	RNA-Konzentrationsmessung, Qualitätsbestimmung
<i>Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay</i>	Nr.: G7791, Promega, Madison, USA	Analyse der Apoptoserate in Osteoklasten und Osteoblasten
<i>BCA Protein Assay Kit, Pierce®</i>	Nr.: 23227F, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	Protein-Konzentrationsmessung
<i>BrdU Cell Proliferation ELISA, colorimetric</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	Analyse der Proliferationsrate von Osteoblasten
<i>BrilliantR II SYBR Green QPCR Master Mix</i>	Stratagene, La Jolla, USA	quantitative RT-PCR
<i>Cytotoxicity Detection Kit, LDH</i>	Nr. 11644793001, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Messung der Laktatdehydrogenase, Zytotoxizitätsbestimmung
<i>Dako ARK™ (Animal Research Kit), Peroxidase</i>	Nr. K3954, Dako North America Inc., Carpinteria, USA	Immunhistochemie
<i>QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit</i>	Nr.: DALP-250, BioAssay Systems, Hayward, USA	Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität in Osteoblasten

3.1.6 Primäre Antikörper

Ratte – anti – Substanz P Monoklonaler Antikörper (SP)	Nr.: sc-21715, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	1:100, Puffer: 5% BSA in PBS
Kaninchen-anti-Substanz P Rezeptor Polyklonaler Antikörper (NK1R)	Nr.: AB5060, Chemicon, Schwalbach, Deutschland	1:250, Puffer: 5% BSA in PBS

Kaninchen-anti-Tyrosinhydroxylase Polyklonaler Antikörper (TH)	Nr.: AB152, Chemicon, Schwalbach, Deutschland	1:100, Puffer: 5% BSA in PBS
Kaninchen-anti- α_{1D} -Adrenorezeptor Polyklonaler Antikörper, extrazellulär (α_{1D} -AR)	Nr.: AAR-019, Alamone Labs, Jerusalem, Israel	1:100 Puffer: 1% NGS in PBS
Kaninchen-anti- α_{2B} -Adrenorezeptor Polyklonaler Antikörper, extrazellulär (α_{2B} -AR)	Nr.: AAR-021, Alamone Labs, Jerusalem, Israel	1:100 Puffer: 1% NGS in PBS
Kaninchen-anti- β_2 -Adrenorezeptor, Polyklonaler Antikörper (β_2 -AR)	Nr.: ab36956, Abcam, Cambridge, Großbritannien	5 μ g/ml Puffer: 1% NGS in PBS
Maus-anti-Kollagen X, Clone X53	Nr.: 2031501005, Quartett, Berlin, Deutschland;	1:25 Puffer: DAKO [®] Animal Research Kit
Maus-anti-Runx2, Monoklonaler Antikörper (Runx2)	Nr.: ab76956, Abcam, Cambridge, Großbritannien	1:50 Puffer: DAKO [®] Animal Research Kit

3.1.7 Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor [®] 488 F(ab') ₂ Fragment, Ziege anti-Hase IgG (H+L) Antikörper	Nr.: A11070, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	1:400, Puffer: 1% NGS in PBS
Alexa Fluor [®] 488 Ziege anti-Ratte IgG (H+L) Antikörper	Nr.: A11006, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	1:400, Puffer: 1% NGS in PBS
Alexa Fluor [®] 568 Esel anti-Hase IgG Antikörper	Nr.: A10042, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	1:400, Puffer: 1% NGS in PBS

3.2 Methoden

3.2.1 Mausstämme

Alle Tiere wurden unter SPF-Bedingungen im universitätseigenen Tierlaboratorium H4 gehalten. Den Mäusen wurde Wasser und Futter *ad libitum* gewährt. Sie wurden bei gleichbleibender Raumtemperatur und einem 12-stündigem Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Die Versuche wurden durch die lokalen Behörden und durch die Ethik-Kommission in Würzburg genehmigt (Az: 54-2532.1-26/10). Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 8-10 Wochen verwendet.

C57Bl/6J Mäuse

Die Mäuse wurden mit einem Alter von 6 Wochen bei der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bestellt und nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase willkürlich auf zwei Gruppen verteilt. Eine Gruppe von C57Bl/6J Mäusen wurde als Wildtyp (WT)-Kontrolle verwendet. Die zweite Gruppe wurde einer Sympathektomie unterzogen.

Sympathektomierte Mäuse (SyX)

Eine Gruppe C57Bl/6J Mäuse wurde durch intraperitoneale (i.p.) Gabe von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, 80mg/kg KG) an den Tagen -8, -7 und -6 vor dem Setzen der Frakturen einer chemischen Sympathektomie unterzogen. Bei Langzeitversuchen wurde die Sympathektomie durch eine zusätzliche Gabe von 6-OHDA an Tag 14 nach dem Setzen der Frakturen aufrechterhalten. Die Behandlung mit 6-OHDA führt zu einer selektiven Zerstörung der katecholaminergen Neuronen und zu einer Reduktion der Konzentration des Neurotransmitters Noradrenalin um 80 % (Harle et al. 2005). Die Tiere werden im weiteren Textverlauf als sympathektomierte bzw. SyX-Mäuse bezeichnet.

Tachykinin1-defiziente Mäuse

Dieser Mausstamm basiert auf dem Hintergrund von C57Bl/6J Mäusen. Das Tachykinin1 Gen wurde durch eine gezielte Mutation ausgeschaltet (Zimmer et al. 1998). Die Mäuse entwickeln sich normal, sind fertil und produzieren die Tachykinine Substanz P und Substanz K nicht mehr. Sie wurden in eigener Zucht nachgezogen. Im Folgenden werden sie mit dem Kürzel Tac1-/- bezeichnet.

3.2.2 Frakturmodelle

Die Frakturen wurden an 8 – 10 Wochen alten Mäusen durchgeführt.

Die Anästhesie wurde i.p. mit einer Injektion von 90-120 mg Ketamin und 6-8 mg Xylazin pro kg KG durchgeführt. Dies führte zu einer verlässlichen Narkose nach ca. 20 Min Wartezeit und einer Gesamtdauer der Narkose bis zum Erwachen der Tiere von ca. 2 h. Auf die Augen wurde während der Narkose eine Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasen Salbe) aufgebracht um das Austrocknen zu

verhindern. Nach dem operativen Eingriff, Dauer ca. 20 Min, wurden die Tiere unter einer Wärmelampe positioniert um ein Auskühlen zu verhindern. Zur post-operativen Schmerzbehandlung wurde Buprenorphin Hydrochlorid subkutan (0,1 µg/g Körpergewicht) direkt nach der Operation sowie an den folgenden zwei Tagen verabreicht. Anschließend wurden die Mäuse im 48 h Rhythmus kontrolliert.

3.2.2.1 Stabilisierte Femurfrakturen

Für die biomechanischen Tests und die µCt Analysen wurden stabilisierte Femurfrakturen in den linken, hinteren Extremitäten der Mäuse gesetzt. Die Frakturen für die biomechanischen Tests wurden in Kooperation mit Dr. Richard Stange und Dr. Britta Wieskötter von der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Münster durchgeführt. Dr. Hans-Robert Springorum von der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Regensburg, setzte die stabilisierten Femurfrakturen für die µCt Analysen.

Das linke, hintere Bein wurde depiliert und mit Alkohol desinfiziert. Mit einem Skalpell (Feather Safety Razo Co., LTD., Osaka, Japan) wurde über der Patella ein Schnitt gesetzt und die Patella wurde lateral platziert. Mit Hilfe einer Injektionsnadel (0,5 mm ø, 24G, BD Microlance™, Franklin Lakes, USA) wurde zwischen den Kondylen ein Loch gesetzt und so der intramedulläre Kanal geöffnet (Abb.: 10 A, B). Über die Injektionsnadel wurde ein 0,2 mm dicker Wolframdraht (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) in den Markraum eingeführt (Abb.: 10 C). Die Injektionsnadel wurde entfernt, wobei der Wolframdraht im Markraum des Femurs verblieb, mit Hilfe einer Frakturmaschine (Feinmechanikwerkstatt der Universität Regensburg) wurde dann eine geschlossene transversale Fraktur in der Diaphyse der Femora erstellt (Abb.: 10 D). Über den im Markraum befindlichen Wolframdraht konnte die Injektionsnadel wieder in den intramedullären Kanal geschoben werden um die beiden Frakturrenden so zu verbinden und zu stabilisieren. Der Wolframdraht wurde herausgezogen und das distal überstehende Ende der Injektionsnadel abgetrennt und abgeflacht (Abb.: 1 E, F). Die Patella wurde abschließend wieder in ihre ursprüngliche Position gebracht und der Schnitt mit einem chirurgischen Faden zugenäht (siehe Abb.: 10 A-F) (Schmidmaier et al. 2004, Bertrand et al. 2013).

Nach 21 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert. Die frakturierten wie auch die kontralateralen, unfrakturierten Femora wurden entnommen und bei -20°C gelagert.

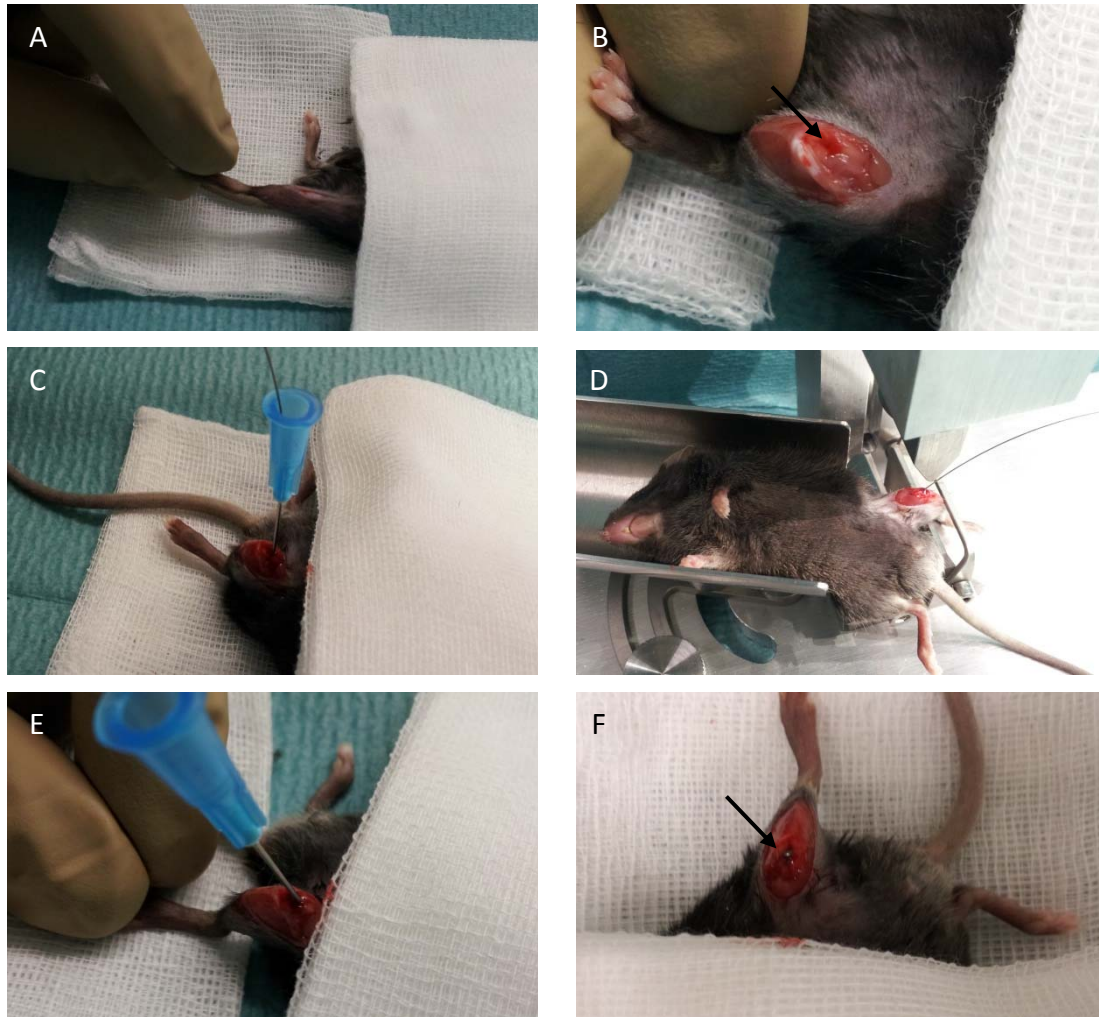


Abbildung 10: Setzen einer stabilisierten Femurfraktur an der linken, hinteren Extremität einer Maus. (A) Öffnen der Haut über der Patella, die Patella wurde anschließend seitlich gelagert. (B) mittels Injektionsnadel geöffnete Femurkondyle (Pfeil). (C) ein Wolframdraht wurde über die Injektionsnadel in den Markraum des Femurs eingeführt, anschließend wurde die Injektionsnadel herausgezogen. (D) Mit Hilfe einer Frakturmaschine wurde eine standardisierte transversale Femurfraktur gesetzt, der Wolframdraht diente als Stütze der Frakturrenden, so dass diese sich nicht in unterschiedliche Richtungen verschieben konnten. (E) Die Injektionsnadel wurde über den Wolframdraht wieder zurück in den Markraum des Femur geschoben um die Frakturrenden zu verbinden und so die Fraktur zu stützen. (F) Zuletzt wurde die Injektionsnadel direkt an der Femurkondyle abgeschnitten und abgeflacht (Pfeil) um die Patella wieder in ihre ursprüngliche Position schieben zu können.

3.2.2.2 Unstabilisierte Tibiafrakturen

Für die Messung der Berührungssensibilität, die Immunhistologie, der morphometrischen Auswertungen und die Herstellung der Kallusexplantatkulturen wurden geschlossene transversale Tibiafrakturen verwendet. Die Fraktur wurde im distalen Bereich der Tibia durch manuelle 3-Punkt-Biegung gesetzt. Es erfolgte keine weitere Stabilisierung. Die Mäuse wurden zu den jeweiligen

Zeitpunkten der entsprechenden Versuche, d.h. 5, 8, 9 bzw. 13 Tage nach dem Setzen der Frakturen, euthanasiert.

3.2.3 Bewegungsverhalten

Es wurde ein Verhaltenstest durchgeführt, um Unterschiede in der Mobilität der Mäuse vor den Frakturen zu analysieren, da ein unterschiedliches Maß an Bewegung die Frakturheilung beeinflussen kann. Sechs Standardkäfige der Größe II wurden in zwei Reihen zu je drei Käfigen dicht nebeneinander positioniert (Abb. 11 A). Über die Käfige wurde auf einem Stativ eine Kamera angebracht (*HandyCam*, Sony, Brooklands, USA), so dass der Winkel, in dem die Kamera die Käfige filmte, zu jedem der sechs Käfige ähnlich groß war (Schema, Abb. 11 B). Die Mäuse wurden einzeln in die Käfige gesetzt, was der Situation beim Umsetzen in einen neuen Käfig während der Haltung der Tiere gleicht ("Home cage"). Dann wurde das Bewegungsverhalten der Mäuse ca. 60 Min durch die Kamera aufgezeichnet. Die Software *EthoVision XT 7* (Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) ermöglichte die Detektion der einzelnen Mäuse in ihren Käfigen und analysierte so die während der Dauer der Aufnahme zurückgelegte Gesamtstrecke [cm] und die durchschnittliche Geschwindigkeit [cm/Sek], mit der sich die Mäuse bewegten.

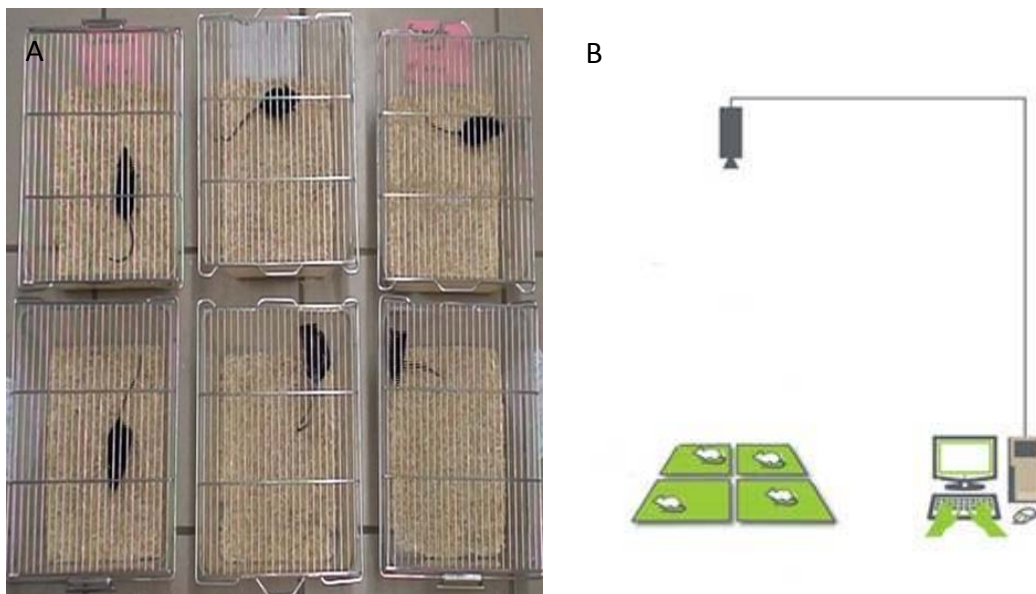


Abbildung 11: Analyse des Bewegungsverhaltens (Mobilität) von WT-Kontrollen, SyX- und Tac1-/- Mäusen. (A) Darstellung eines Filmausschnitts der 6 Käfige in denen das Bewegungsverhalten der Mäuse im Verlauf von ca. 60 Min aufgezeichnet wurde. (B) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Kamera, Mäusen und Software *EthoVision XT* welche die Bewegung über die Aufnahme analysiert (modifiziert nach Noldus Information Technology; <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/ethovision-xt>; 03.02.2015).

Für die Aufnahmen wurde darauf geachtet, dass SyX- bzw- Tac1-/- Mäuse immer in Verbindung mit WT-Kontrollmäusen gefilmt wurden, und dass die Aufnahmen immer an gleicher Stelle und gleicher Uhrzeit getätigt wurden, um Tageszeit-abhängige Schwankungen im Verhalten der Tiere auszuschließen.

3.2.4 Dynamic Plantar Aesthesiometer Test – Analyse der Berührungssensibilität

Mit zunehmenden Schmerzen verändert sich die Berührungssensibilität und folglich die Belastung der frakturierten Beine. Unterschiede im Berührungsempfinden wurden daher mit dem *Dynamic Plantar Aesthesiometer Test* (Nr.: 37450, Ugo Basile, Comerio, Italien) analysiert. Hierfür wurden die Mäuse, wie in Abb. 12 zu sehen ist, jeweils in ein Plexiglas-Kompartiment auf eine Gitter-Plattform gesetzt. Zu Beginn zeigten die Mäuse ein ausgeprägtes Erkundungsverhalten. Nach einiger Zeit wurden die Mäuse ruhiger und verweilten für einen längeren Zeitpunkt in einer Position. In diesem Moment wurde der elektrische Simulator mit dem von Frey Filament (0,5 mm \emptyset) mit Hilfe eines Spiegels unterhalb der linken oder rechten Pfote der hinteren Extremität positioniert. Es wurde darauf geachtet, dass das von Frey Filament jeweils unter dem gleichen Zielpunkt auf der Fußsohle ausgerichtet wird. Durch betätigen des Startknopfes am Simulator wurde das von Frey Filament elektrisch nach oben gehoben bis es den Zielpunkt an der Sohle der jeweiligen Pfote berührte. Diese Berührung war noch unterhalb der Empfindungsgrenze der Mäuse (Kraftaufwand angegeben als 0 g). Das Filament wurde dann vom Simulator mit gleichbleibender Geschwindigkeit und stetig zunehmender Kraft nach oben gegen die Pfote gedrückt. Wurde der Punkt, an dem die Maus die Berührung als unangenehm empfand, überschritten, zog die Maus die Pfote zurück. Dieser Reflex wurde durch die Latenzzeit bis zum Zurückziehen der Pfote (in Sek.) und dem Kraftaufwand (in g), der zu diesem Zeitpunkt vom Simulator aufgewendet worden war, festgehalten. Die Messung der Berührungssensibilität wurde an der linken und rechten hinteren Extremität pro Zeitpunkt jeweils drei Mal durchgeführt. Die drei Einzelwerte wurden anschließend gemittelt. Fünf Tage vor dem Setzen der Frakturen wurde eine erste Messung durchgeführt. So wurden die Tiere an die neue Situation gewöhnt und dadurch Mess-Ungenauigkeiten vermindert. Drei Tage und direkt vor dem Setzen der Frakturen wurde die Berührungssensibilität in den Pfoten beider Hinterbeine getestet und ein Mittelwert daraus gebildet, der die Berührungssensibilität der nicht frakturierten Beine widerspiegelte. Weitere Messungen fanden 5 und 8 Tage nach der Fraktursetzung am linken frakturierten sowie am rechten unfrakturierten Bein statt.



Abbildung 12: Aufbau des *Dynamic Plantar Aesthesiometer Tests*. Die Mäuse sitzen in abgetrennten Kompartimenten auf einem Gitter. Ein automatisierter, elektrischer Simulator mit dem von Frey Filament (roter Pfeil) kann unterhalb den Mäusen in die richtige Position gebracht werden um das von Frey Filament auf Knopfdruck automatisiert nach oben gegen die Sohle der Pfote zu bewegen. Die Kraft [g] und die Latenzzeit [Sek] beim zurückziehen der Pfoten werden automatisiert gemessen (schwarzer Pfeil).

3.2.5 Vermessung der Frakturkalli

Die Mäuse wurden an Tag 8 nach dem Setzen der Frakturen mit Hilfe von CO₂ und anschließendem Genickbruch euthanasiert. Die linken Hinterbeine wurde mit 70% Propanol desinfiziert und die Haut an den linken, frakturierten Beinen von der Pfote angefangen bis zum Oberschenkel entfernt. Die Beine wurden am Oberschenkelknochen durchtrennt, um die weiteren Schritte leichter durchführen zu können. Anschließend wurde das Weichgewebe, wie Muskeln und Sehnen, vorsichtig und sorgfältig von den Frakturkalli und den Tibiae abgelöst. Es wurden die Höhe, Breite und Tiefe der Frakturkalli bestimmt, Abb. 13 zeigt, wie Höhe, Breite und Tiefe an den Frakturkalli jeweils definiert wurde. Die genauen Maße wurden mit einer Schublehre und zusätzlich mit einem Millimeterpapier und einem Lineal ermittelt. Aus den Maßen (Höhe, Breite, Tiefe) wurde anhand nachfolgender Formel das Volumen der Frakturkalli berechnet: $\text{Volumen} = 0,75 \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c$ (mit a=Höhe, b=Breite, c=Tiefe). Die Frakturkalli wurden, um ihr Gewicht zu bestimmen, vorsichtig mit einem Skalpell längs an einer Seite aufgeschnitten und vom Knochen abgelöst. Danach wurde ihr Gewicht mit einer Feinwaage bestimmt (elektronische Präzisionswaage, KERN 770/GS/GJ, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland). Abschließend wurde die Dichte der Frakturkalli durch Division des Gewichtes durch das Volumen bestimmt.

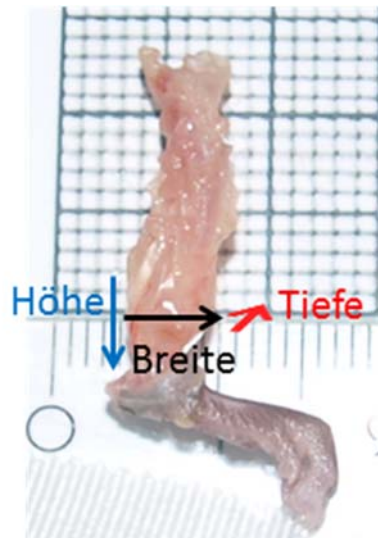


Abbildung 13: Maustibia mit Frakturkallus. Die Richtungen der Pfeile zeigen in welcher Orientierung die Höhe (blau), die Breite (schwarz) und die Tiefe (rot) der Kalli gemessen und festgehalten wurden.

3.2.6 Kultivierung der Kallus-Explantatkulturen

Im Anschluss an die Vermessung wurden die Kalli mit PBS sorgfältig gespült und als Explantate unter Zellkulturbedingungen 7 Tage lang kultiviert. Um zu gewährleisten, dass das Medium während der weiteren Kultivierungszeit bestmöglich durch den Knorpel diffundieren kann, wurden die Kalli mit einem Skalpell in 2-3 mm große Stücke zerkleinert und in einem Well einer 6-Well Platte (Costar 3516, Corning, NY, USA) 7 Tage in chondrogenem Medium (3 ml/well, DMEM *high glucose*, Antibiotika/Antimycotika 1%, ITS+premix 1:100, Pyruvat 110 µg/ml, Prolin 40 µg/ml, Ascorbatsäure-2-Phosphat 50 µg/ml, Dexamethason 50nM und TGF β 5ng/ml) im Inkubator (Heraeus HERAcCell®, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂ – Gehalt kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

3.2.7 Stimulation der Kallus-Explantatkulturen mit Interleukin-1β (IL-1β), SP und NA

Um die Einflüsse der Neurotransmitter Substanz P (SP) und Noradrenalin (NA) auf die Zellen in den Explantatkulturen zu untersuchen, wurden Stimulationsversuche durchgeführt. Das chondrogene Medium zufällig ausgewählter Explantatkulturen wurde während der letzten 24 h des Kultivierungszeitraums entweder mit 10⁻⁸ M/10⁻¹⁰ M SP oder 10⁻⁶ M/10⁻⁸ M NA versetzt. In einigen Kulturen wurde durch zusätzliche Zugabe von Interleukin-1β (IL-1β; 0,5µg/ml Medium) ± 10⁻⁸ M/10⁻¹⁰

M SP oder 10^{-6} M/ 10^{-8} M NA, eine Entzündung simuliert. Ein Teil der Explantatkulturen wurde nur in chondrogenem Medium kultiviert und wird folgend als „unstimuliert“ bezeichnet.

3.2.8 Isolierung primärer Knochenmarksmakrophagen und Osteoblasten

Die Knochenmarksmakrophagen (BMMs, *bone marrow macrophages*) zur Osteoklastendifferenzierung wie auch die Osteoblasten wurden nach modifizierten Protokollen isoliert (Dillon et al. 2012, Bakker and Klein-Nulend 2012, Orriss and Arnett 2012). Die Mäuse wurden mittels CO₂ euthanasiert und mit 2-Propanol desinfiziert. Anschließend wurden die Röhrenknochen (Femur, Tibia, Humerus, Radius, Ulna) frei präpariert, kurz mit 70% Ethanol desinfiziert, an den Gelenken vom restlichen Skelett abgetrennt und in PBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Mit einer Schere und einem Skalpell wurde das Weichgewebe so gut wie möglich vom Knochen durch vorsichtiges abschaben entfernt und der Knochen sorgfältig mit PBS gespült. Um das Knochenmark aus den Röhrenknochen zu isolieren, wurden die Epiphysen abgetrennt und die Röhrenknochen in eine Petrischale (Nr.: 632180, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 10 ml Medium überführt. Mit einer 27G Injektionskanüle (BD Microclance™, Franklin Lakes, USA) und einer 5 ml Spritze (BD Discardit™ II, Nr. 300928, Franklin Lakes, USA) wurde Medium aufgesaugt, die Injektionskanüle wurde vorsichtig in jeweils ein offenes Ende der Röhrenknochen geschoben und dann das Knochenmark mit dem Medium aus dem Röhrenknochen gespült bis sich der Knochen vollkommen weiß entfärbt hatte. Das Medium mit den Knochenmarkszellen wurde über ein 40 µm Zellsieb (Greiner Bio-One, Nr.: 542040, Frickenhausen, Deutschland) in ein 50 ml Falcon (Corning, Nr.: 430829, NY, USA) transferiert; mit dem Stempel der Spritze wurde mehrmalig auf das Sieb geklopft, um vorhandene Zellhaufen zu vereinzeln und anschließend wurde mit Medium nachgespült. Die Zellen wurden 5 Min bei RT und 1200 rpm (Hettich ROTANTA/P Zentrifuge Typ 3502; Hettich AG, Bäch, Schweiz) abzentrifugiert, das Medium wurde abgenommen und die Erythrozyten durch Zugabe von 9 ml eiskaltem, sterilem Aqua dest. lysiert. Sofort im Anschluss wurde 1 ml 10-fach PBS zugegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet wurde in 10 ml Medium (alpha-MEM, FCS 10%, Antibiotika/Antimycotika 1%, GlutaMAX 2%, M-CSF 20ng/ml) resuspendiert und je 5 ml in einer Petrischalen (Ø 10 cm) für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Inkubator kultiviert.

Die oben zur Isolierung primärer BMMs verwendeten Diaphysen der Röhrenknochen wurden anschließend in 50 ml Falcons überführt und in 4 ml Kollagenase-Typ II-Lösung (330 Units/mg, Worthington, 5,3 mg/10 ml PBS) für 40 Min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert, wobei die Lösung

nach 20 Min durch frische Kollagenase-Typ II-Lösung ersetzt wurde. Durch Zugabe von Medium (DMEM low glucose, FCS 10%) wurde die Kollagenasereaktion gestoppt, die Lösung wurde abgenommen und die Röhrenknochen 3 mal mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die Knochen in eine frische Petrischale überführt, mit einem Skalpell in kleinere Stücke geschnitten und in Standardmedium (DMEM low glucose, FCS 10%, Antibiotika/Antimycotika 1%, Ascorbatsäure-2-Phosphat 100µM) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert, bis die aus den Knochen ausgewachsenen Zellen konfluent waren (11-18 Tage). Die Zellen begannen nach ca. 2-3 Tagen aus den Knochenexplantaten auszuwachsen. Das Medium wurde ab dem 4. Tag alle 3 Tage gewechselt.

3.2.9 Differenzierung der Knochenmarksmakrophagen zu Osteoklasten

Das Medium der, aus dem Knochenmark isolierten, BMMs wurde 2 Tage nach der Aussaat abgenommen, die Zellen wurden mit kaltem PBS (4°C) gewaschen und mit 5 ml 0,02% EDTA in PBS (4°C, auf Eis) von der Petrischale abgelöst. Mit einem Zellheber (Croning, Nr.: 3008, NY, USA) wurden restliche, noch anhaftende Zellen angehoben. Die Zellen wurden in ein Falconröhrchen überführt und 5 Min bei RT und 1200 rpm (Hettich ROTANTA/P Zentrifuge Typ 3502; Hettich AG, Bäch, Schweiz) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml Medium (alphaMEM, FCS 10%, Penicillin/Streptavidin 1%, GlutaMAX 2%) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Cedex Cell Counters (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Deutschland) ermittelt und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die Versuche wurden die Zellen in Triplikaten mit 5000 Zellen/Well einer 96-Well Platte (Corning, Nr.:3596, NY, USA) in Differenzierungsmedium (alphaMEM, FCS 10%, Antibiotika/Antimycotika 1%, GlutaMAX 2%, M-CSF 20ng/ml, RANKL 10ng/ml) ausgesät, wodurch die Knochenmarks-Makrophagen zu Osteoklasten (Zellen ≥ 3 Zellkerne) differenzierten. Die Zellen wurden für 5 Tage differenziert, das Medium wurde nach 3 Tagen gewechselt.

3.2.10 Differenzierung der Osteoblasten

Nach ca. 15 Tagen waren die aus den Knochenexplantaten ausgewachsenen Zellen konfluent, das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch 2 ml Trypsin wurden die Zellen abgelöst, die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium (alphaMEM DNA/RNA, FCS 10%) gestoppt, die Zellen wurden in ein Falcon überführt und bei RT und 1200 rpm (Hettich ROTANTA/P Zentrifuge Typ 3502; Hettich AG, Bäch, Schweiz) für 5 Min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl ermittelt (Cedex Cell

Counter). Anschließend wurde die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 5000 Zellen/Well in einer 96-Well (Corning) Platte in Triplikaten für die Versuche in osteogenem Medium (alphaMEM DNA/RNA, FCS 10%, Antibiotika/Antimycotika 1%, GlutaMax 4mM, Ascorbatsäure-2-Phosphat $100 \mu\text{M}$, β -Glycerophosphat 10mM, Dexamethason 100nM) ausgesät. Die Zellen wurden für 7 und 21 Tage differenziert, das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

3.2.11 Isolierung der RNA

3.2.11.1 RNA aus Kallus-Explantatkulturen

Schritt 1 - Homogenisierung des Gewebes: Zur Isolierung der RNA aus den Explantatkulturen wurde das Medium aus den Wells abgenommen und bei -80°C für weitere Analysen weggefroren. Die Kallus-Stückchen wurden mit PBS gespült, nochmals mit einem Skalpell auf eine Größe von ca. 1×1 mm zerkleinert und zusammen mit $500 \mu\text{l}$ peqGOLD TriFast™ Reagenz in vorbereitete Precellys Tubes (*Precellys Ceramic Kit 1.4 / 2.8 mm*, Nr.:91-PCS-CKM, Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland) überführt. Die Tubes wurden 5 Min bei RT inkubiert und anschließend bis zur Homogenisierung auf Eis gelagert. Zur Homogenisierung wurde der Precellys Homogenisator zusammen mit dem Cryolys Kühlmodul (Peqlab Biotechnology GmbH, Nr.: 91-PCS24 und 91-PCS-Cryo, Erlangen, Deutschland) bei einer Kühltemperatur von ca. $-4^\circ - 0^\circ \text{C}$ verwendet. Es wurde ein Programm mit einer Geschwindigkeit von 3 mal 6500 rpm jeweils 30 Sek und Pausen von jeweils 30 Sek gewählt. Anschließend wurden die Proben zur Lagerung bei -80°C weggefroren.

Schritt 2 - RNA Isolierung: Zu den auf Eis aufgetauten Proben wurden nochmals je $500 \mu\text{l}$ frisches peqGOLD TriFast™ Reagenz zugefügt und 5 - 10 Min bei RT inkubiert, um einen möglichst vollständigen Aufschluss der Zellen zu gewährleisten. Die gesamten $1000 \mu\text{l}$ TriFast Reagenz je Probe wurden aus den Precellys Tubes in $1,5 \text{ ml}$ Eppendorf Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und bei 13400 rpm (Tischzentrifuge MiniSpin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) 5 Min bei RT zentrifugiert um eventuell vorhandene Extrazelluläre Matrixreste zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Tube gegeben, mit $200 \mu\text{l}$ Chloroform versetzt und für 15 Sek kräftig geschüttelt. Während einer 5-minütigen Inkubation bei RT und anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 13400 rpm (Tischzentrifuge MiniSpin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) entstanden drei Phasen (RNA-Phase, Protein-Phase, DNA-Phase), von denen die klare, wässrige Phase (oberste Phase) zur weiteren RNA-Isolierung in ein neues Eppendorf Gefäß überführt wurde. Die organischen Phasen wurden bei -80°C für eine mögliche Proteinisolierung gelagert. Durch Zugabe von $500 \mu\text{l}$ 2-Propanol (2-Propanol/ROTIPURAN®) wurde die RNA bei -20°C 72 h präzipitiert.

Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation bei 13400 rpm (Tischzentrifuge MiniSpin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und 4°C 10 Min pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das RNA Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol (Roth) gewaschen und an der Luft für 5 Min getrocknet. Das Pellet wurde in 23 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Der *Absolutely RNA Nanoprep Kit* wurde zur weiteren Aufreinigung nach Herstellerangaben verwendet (Änderung: 70% Ethanol an Stelle von 80% Sulfolan). Hierfür wurde die in RNase freiem Wasser gelöste RNA mit 100 µl eines β-Mercaptoethanol-haltigen Lysepuffers gemischt. Anschließend wurde die gleiche Menge 70%iger Ethanol zugegeben. Die RNA wurde durch einen 60 Sek Zentrifugationsschritt an eine silicatische Fasermatrix gebunden und durch einen nachfolgenden DNase Verdau und Waschschritten mit einem Hoch-Salz- und einem Niedrig-Salz-Puffer aufgereinigt. Zuletzt wurde die RNA in 13 µl Elutionspuffer, der zuvor auf 60°C erhitzt worden war, eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.11.2 RNA aus Osteoblasten und Osteoklasten

Zur Isolierung der RNA aus den Osteoblasten und Osteoklasten wurde der *Absolutely RNA Miniprep Kit* entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden mit je 100 µl Lysepuffer in den Wells der 6-Well Platten (Corning) mit einem β-Mercaptoethanol-haltigen Puffer lysiert, mit der gleichen Menge 70% Ethanol gemischt und durch einen Zentrifugationsschritt (13400 rpm; Tischzentrifuge MiniSpin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) an die silicatische Fasermatrix der RNA-Binde-Säule gebunden. Es folgte ein Waschschriff mit einem Niedrig-Salz-Puffer. Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt und die RNA durch einmaliges Waschen mit einem Hoch-Salz-Puffer und zweimaligem Waschen mit einem Niedrig-Salz-Puffer aufgereinigt. Die RNA wurde schließlich in 30 µl Elutionspuffer, der auf 60°C erhitzt worden war, eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.12 RNA-Konzentrations-, Qualitätsbestimmung und cDNA Synthese

Die Qualität der RNA wurde mittels Bioanalyser (*Agilent 2100 Bioanalyzer/2100 Expert Software/Agilent RNA 6000 Nano Kit*, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) überprüft. Hierbei wurde die RNA in 2 µl Elutionspuffer durch Erhitzen auf 70°C denaturiert, durch Zugabe eines Fluoreszenzmarkers visualisiert und ihrer Größe entsprechend elektrophoretisch über Mikrokanäle aufgetrennt. Anhand der Menge der 18S und 28S rRNA Untereinheiten und des Graphen im Elektropherogramm wurde mit einem speziellen Algorithmus die Qualität der RNA in Form des RIN Wertes (*RNA integrity number*) und ihre Konzentration berechnet. Degradierete RNA hat einen RIN

Wert von 1, je weniger die RNA degradiert ist, desto höher der RIN Wert, ein RIN Wert von 10 steht für eine intakte RNA. Durch Verwendung des *AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit* wurde mit einer reversen Transkriptase aus den RNA-Proben (mit einem RIN Wert größer als 6) einzelsträngige cDNA hergestellt. Pro Ansatz konnten bis zu 3 µg RNA nach folgendem Reaktionsansatz transkribiert werden:

✓ cDNA Synthesis Master Mix (2x conc.)		10 µl
✓ Oligo(dT) primers		3 µl
✓ AffinityScript RT/ RNase Block Enzyme Mixture		1 µl
✓ RNA (0,3 µg – 3 µg)		X µl
✓ Aqua dest.	auffüllen bis	20 µl

Das *Annealing* der Primer wurde durch Inkubation bei 25°C 5 Min eingeleitet. Danach wurde durch einen 15-minütigen Schritt bei 42°C die cDNA synthetisiert. Die 5-minütige Inkubation bei 95°C beendete die Reaktion. Die entstandene cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.13 Quantitative real-time PCR

Um Änderungen im Expressionsmuster verschiedener Gene zu untersuchen wurden mit Hilfe der Software *Primer3* (sourceforge.net®) und der Genomdatenbank *Ensemble* (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, UK, www.ensembl.org/index.html) Primer für unterschiedliche Zielsequenzen entworfen. Die spezifischen Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland) geordert (Tabelle 1). Es wurde eine Endkonzentration von 1 nM der einzelnen Primer verwendet.

Tabelle 1: Angaben der für die quantitative RT-PCR verwendeten "forward" und "reverse" Primer mit Sequenzen, Schmelzpunkt und Produktlänge.

Genname	Orientierung	Sequenz 5' – 3'	Tm [°]	Produktlänge [bp]
<i>gapdh</i>	forward	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG	55,3	223
	reverse	ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA	57,3	

Material und Methoden

<i>β-actin</i>	forward	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC	59,4	228
	reverse	CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA	59,4	
<i>timp-1</i>	forward	CAT GGA AAG CCT CTG TGG AT	57,3	132
	reverse	CTC AGA GTA CGC CAG GGA AC	61,4	
<i>timp-2</i>	forward	TGA TCA GAG CCA AAG CAG TG	57,3	299
	reverse	GCT CTT CTT CTG GGT GAT GC	59,4	
<i>timp-3</i>	forward	CAC GGA AGC CTC TGA AAG TC	59,4	185
	reverse	AAT TGC AAC CCA GGT GGT AG	57,3	
<i>mmp-2</i>	forward	ACA CTG GGA CCT GTC ACT CC	61,4	117
	reverse	TGT CAC TGT CCG CCA AAT AA	55,3	
<i>mmp-3</i>	forward	TGG AGA TGC TCA CTT TGA CG	57,3	120
	reverse	GCC TTG GCT GAG TGG TAG AG	61,4	
<i>mmp-14</i>	forward	AGT CAG GGT CAC CCA CAA AG	59,4	210
	reverse	GCA TTG GGT ATC CAT CCA TC	57,3	
<i>IL-6</i>	forward	CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG	61,4	134
	reverse	CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC	55,3	
<i>MIP-2</i>	forward	GCC AAG GGT TGA CTT CAA GA	57,3	209
	reverse	CTT CAG GGT CAA GGC AAA CT	57,3	
<i>cox2</i>	forward	CGA AAT CAA CAA CCC CGT AT	55,3	171
	reverse	GGC AGA ACG ACT CGG TTA TC	59,4	
<i>iNos</i>	forward	CAA GCA CCT TGG AAG AGG AG	59,4	149
	reverse	AAG GCC AAA CAC AGC ATA CC	57,3	

Die exponentielle DNA Amplifikation wurde mit dem MX3005P QPCR System und der zugehörigen Software MxPro (Agilent Technologies, Stratagene, La Jolla, USA) gemessen. Als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff wurde BrilliantR II SYBR Green (BrillantR II SYBR Green QPCR Master Mix) verwendet. Der Reaktionsansatz zur Amplifikation der Zielsequenzen wurde wie folgt pipettiert:

✓ <i>reverse</i> Primer		0,5 µl
✓ <i>forward</i> Primer		0,5 µl
✓ BrilliantR II SYBR-Green Master Mix		12,5 µl
✓ Rox-Reference-Dye		0,375 µl
✓ cDNA (30 ng)	bis zu	5 µl
✓ Aqua mol. biol.	auffüllen bis	25µl pro Reaktionsansatz

Für jede Zielsequenz wurden Duplikate angesetzt. Die Ansätze wurden in 96-Well-PCR-Platten (Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland) pipettiert und im Thermocycler TGradient 96 (Biometra GmbH Göttingen, Deutschland) zu Beginn 10 Min bei 95°C denaturiert. Anschließend folgten 40 Amplifikationszyklen (30 Sek Denaturieren bei 95°C/ 60 Sek Annealing bei 60°C/ 60 Sek Elongation bei 72°C). Zuletzt wurden die Schmelzkurven analysiert um die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte zu testen. *Gapdh* und *β-actin* wurden als *Housekeeping*-Gene bzw. als *Normalizer* verwendet. Als Kalibrator diente die cDNA der WT-Kontrollen (Osteoblasten, Osteoklasten, Kallus-Explantate w/o IL-1β). Der Kalibrator wurde auf „0“ gesetzt und die Änderungen der Genexpression in *Syx*- und *Tac1*^{-/-} Mäusen (Osteoblasten, Osteoklasten, Kallus-Explantate w/o IL-1β) wurden in Abhängigkeit zum Kalibrator (Logarithmus zur Basis 2) berechnet.

3.2.14 Zytotoxizitätstest (Laktatdehydrogenase-Test)

In den Medienüberständen aus den Explantatkulturen wurde die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) getestet. Die Zellen in den Explantatkulturen könnten während der Kultivierung absterben. Das Enzym Laktatdehydrogenase ist ein stabiles, zytoplasmatisches Enzym, es wird von Zellen über die durch Zytotoxizität beschädigte Plasmamembran in die Umgebung abgegeben. Der *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche) wurde stichprobenartig mit den Medienüberständen von jeweils 4 Wildtyp-Explantatkulturen nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Test basiert auf einer Enzymreaktion. Zu den Zellkulturüberständen wird ein Reaktionsmix (Katalysator: Diaphorase/NAD⁺ Mix) zugegeben und 30 Min bei RT inkubiert, wobei durch die Enzymreaktion der LDH mit dem Katalysator Formazan entsteht. Die Aktivität des Enzyms LDH im Überstand aus den Zellkulturen korreliert direkt mit der Menge an entstandenem Formazan und gibt so einen quantitativen Aufschluss über die Vitalität der Zellen in den Explantatkulturen. Zur Herstellung einer Positivkontrolle (*High Control*) wurde eine zufällig ausgewählte Explantatkultur 6 h mit 500 µl Triton X-100 Lösung (+ 2,5 ml Medium) im Brutschrank inkubiert. Mit dem Tecan GENios F129004 Microplate Reader (Tecan, Crailsheim Deutschland) wurde die Absorption bei 490 nm (Absorptionsmaximum des Formazans) gemessen. Die Positivkontrolle wurde als 100% gesetzt und die Konzentration der LDH (in %) in den restlichen Überständen in Abhängigkeit von der Positivkontrolle berechnet.

3.2.15 BCA – Assay – Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine in den Zellkulturüberständen wurde der Pierce[®] BCA Protein Assay Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte wie im Protokoll des Herstellers für die Verwendung von 96-Well Platten (Greiner Bio-One, Nr.: 655101, Frickenhausen, Deutschland) angegeben. Die Proben wurden hierfür in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt. Zur Erstellung einer Standardreihe mit bekannten Proteinmengen von 0 – 2000 µg/ml wurde in Aqua dest. gelöstes Bovines Serum Albumin (BSA) verwendet. In Duplikaten wurden jeweils 10 µl der Standardlösungen sowie der zu messenden Proben mit 200 µl BCA-Arbeitslösung gemischt und 15 Min bei 37°C inkubiert. Zum Messen der Absorption wurde der Tecan GENios F129004 Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm verwendet.

3.2.16 BrdU – Assay – Messung der Zellproliferation

Unterschiede im Proliferationsverhalten der Osteoblasten aus WT-Kontrollen, SyX- und Tac1-/- Mäusen wurden mit dem *Cell Proliferation ELISA* der Firma Roche (BrdU-Assay) wie im Protokoll des Herstellers angegeben untersucht. Das Pyrimidin-Analogon BrdU wird während der Zellproliferation an Stelle der Base Thymidin in die DNA eingebaut. Das Analogon BrdU kann dann durch einen Peroxidase (POD)-gekoppelten Antikörper detektiert und dadurch dessen Menge quantifiziert werden. Die Inkubation der Zellen mit dem *BrdU labeling reagent* erfolgte 24 h lang, anschließend wurde das eingebaute BrdU mit dem POD-gekoppelten Antikörper detektiert. Durch Zugabe des Substrat-Puffers erfolgte eine Reaktion mit blauem Farbumschlag. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1M H₂SO₄ gestoppt, die Messung der Absorption wurde mit dem Tecan GENios F129004 Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Die Unterschiede der Zellproliferation wurden prozentual dargestellt, die WT-Kontrollen wurden auf 100% genormt.

3.2.17 Caspase 3/7 – Assay – Messung der Apoptoserate

Um die Apoptoseraten der Osteoklasten und Osteoblasten aus den WT-Kontrollen, den SyX- und Tac1-/- Mäusen vergleichen zu können wurde die Caspase-3/7-Aktivität mit dem *Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay* von Promega gemessen. Das Protokoll wurde nach den Angaben des Herstellers und mit einer 96-Well Black/Clear Platte (BD Falcon, Nr.: 353219, Franklin Lakes, USA) durchgeführt, die Inkubationszeit zur Detektion der Caspase-Aktivität betrug 6 h. Das Substrat Z-DEVD-R110 wurde zusammen mit einem Puffer, welcher die Zellen lysierte, auf die Proben gegeben. Während der Inkubationszeit wurde das Substrat von der Caspase-3/7 durch das Entfernen des DEVD

Peptids zu Rhodamin 110 umgewandelt, dessen Fluoreszenz konnte bei einer Anregung von 499 nm und einer Emission von 521 nm gemessen werden. Die Ergebnisse der aus Tac1^{-/-} und sympthektomierten Mäusen gewonnenen Osteoblasten und Osteoklasten wurden auf die jeweiligen WT-Kontrollen (100%) normiert.

3.2.18 Alkalische Phosphatase (ALP) – Assay – Messung der Osteoblasten-Aktivität

Der QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit wurde verwendet, um die Aktivität des Enzyms ALP in Osteoblasten zu testen. Die Messung der ALP-Aktivität wurde nach dem Protokoll des Herstellers durch Lyse der Zellen in den Wells durchgeführt. Das Enzym ALP katalysiert die Hydrolyse von Phosphatester-Verbindungen in alkalischer Umgebung wodurch organische Radikale und anorganische Phosphate entstehen. Das Enzym ALP wandelt das im Reaktionspuffer des Kits enthaltene p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol und Phosphat um, die Reaktion führt zu einem gelben Farbumschlag, der mit dem Tecan GENios F129004 Microplate Reader bei 405nm Wellenlänge gemessen werden konnte, dabei ist die Intensität der Farbe direkt proportional zur Aktivität des Enzyms. Die Ergebnisse der Osteoblasten aus SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen wurde auf die WT-Kontrollen (100%) normiert.

3.2.19 Kathepsin K – Assay – Messung der Osteoklasten-Aktivität

Das Enzym Kathepsin K spielt beim Abbau der Knochenmatrix durch die Osteoklasten eine wichtige Rolle, die Messung der Enzymaktivität im Überstand der Osteoklastenkultur erlaubt somit Rückschlüsse auf die Aktivität der Osteoklasten. Nach einem Protokoll von Wittrant et al. (Wittrant et al. 2003) wurde die Aktivität von Kathepsin K mit Hilfe des synthetischen Substrats Z-Leu-Arg-AMC gemessen. Es wird durch Kathepsin K gespalten und setzt fluoreszierende Methylcoumarin-Gruppen frei. Nach 5 Tagen Differenzierung wurden die Osteoklasten in den 96 Well Platten weitere 24 h in FCS-freiem Differenzierungsmedium kultiviert. Der Überstand wurde zur Messung der Kathepsin K Aktivität verwendet. Zur Herstellung einer Standardkurve wurde die Verbindung 7-Amino-4-Methylcoumarin von Sigma verwendet. Die Stocklösung von 0,05 M 7-Amino-4-Methylcoumarin wurde 1:200 im Reaktionspuffer verdünnt (\rightarrow 250 μ M), ausgehend davon wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt (250 μ M - 125 μ M - 62,5 μ M - 31,25 μ M - 15,625 μ M - 7,8 μ M; 1:2 Verdünnung, jeweils im Reaktionspuffer). Anschließend wurden jeweils 5 μ l aus den Verdünnungen mit 95 μ l Reaktionspuffer pro Well in einer 96 Well Platte angesetzt (in Duplikaten, Konzentrationen: 0,0039 nmol – 1,25 nmol). Zur Bestimmung der Kathepsin K Aktivität in den Überständen der

Osteoklastenkulturen wurden pro Well jeweils 25 µl des Überstands mit 70 µl Reaktionspuffer und 5 µl (2,55 nmol) der Substratlösung gemischt und 24 h lang im Dunkeln bei 37°C inkubiert (Triplikate). Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stop-Puffer gestoppt und die Fluoreszenz der Methylcoumarin-Gruppen bei 465 nm im Tecan GENios F129004 *Microplate Reader* gemessen (Anregung bei 365 nm). Die Aktivität des Enzyms Kathepsin K wurde in µmol umgesetztes Substrat pro µg Gesamtprotein im Überstand pro 24 h berechnet. Die Ergebnisse wurden prozentual dargestellt, Die Werte der WT-Kontrollen wurden auf 100% normiert.

3.2.20 Herstellung der Paraffinpräparate der unstabilierten Tibiafrakturen

Für die Herstellung der Paraffinpräparate wurden Mäuse mit unstabilierten Tibiafrakturen an Tag 5, 9 und 13 nach Fraktur euthanasiert und in 70% Propanol getaucht (um das Umherfliegen einzelner Haare zu vermeiden). Die Haut und das vorhandene Weichgewebe wurden vorsichtig mit einer Schere und einem Skalpell von den frakturierten Tibiae abgetragen. Die frakturierten Tibiae wurden kurz oberhalb des Sprunggelenks sowie mittig am Kniegelenk herausgeschnitten. Dadurch konnte die Orientierung des Knochens (proximal – distal) im Verlauf der Präparation leicht beibehalten werden. Es folgte eine 24-stündige Fixierung der frakturierten Knochen in 4% Paraformaldehyd in PBS bei 4°C. Anschließend wurden die Knochen in PBS gewaschen und 4 Wochen in 20% EDTA bei einem pH von 7,4 dekalzifiziert. Nach dreimaligem Waschen, jeweils 30 Min in PBS, wurden die Präparate in aufsteigender Ethanol/Isopropanol-Reihe (50% - 3h, 70% - 3h, 96% - üNa, 96% - 4h, Isopropanol - 3h, Isopropanol - 3h, Isopropanol/Paraffin 1:1 Mischung - 24h bei 60°C) in Paraffin (60°C – 1x 24h, 1x 12h) überführt und anschließend eingebettet. Mit einem Mikrotom (RM 2155, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträgern (Menzel-Gläser Superfrost® Plus, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C getrocknet.

3.2.21 Histologie und Immunfluoreszenz

Zu Beginn der FärbeprozEDUREN wurden die Paraffinschnitte der frakturierten Tibiae in zwei 15 minütigen Inkubationsschritten in Roti® Histol und einer absteigenden Ethanol-Reihe (99%, 96%, 90%, 70%, 50%, Aqua dest., jeweils 10 min.) entparaffiniert und rehydriert. Vor der Antikörperfärbung wurden die Schnitte noch 5 Min in PBS gewaschen und 5 Min in 3% Wasserstoffperoxid inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren.

3.2.21.1 Immunfluoreszenzfärbungen

SP, NK1R und TH-Färbung

Nach 3 maligem Waschen in PBS für je 5 Min wurden unspezifische Antikörperbindestellen durch Inkubation für 1 h in 5% Bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert. Die primären Antikörper wurden in geeigneter Verdünnung (siehe 2.1.6) in frischer Blockier-Lösung auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Präparate 3 mal für je 5 Min mit PBS gewaschen und für 1h bei 37°C mit dem zugehörigen sekundären Antikörper, wie unter Punkt 2.1.7 beschrieben, inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS und eine Kernfärbung mit DAPI (10 µM, 10 Min). Die Präparate wurden abschließend mit PBS gespült und mit Fluorescent Mounting Medium (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA) eingedeckt. Mit einem Olympus BX61 Mikroskop (Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden Bilder in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

α1d, α2b und β2 Adrenorezeptor Färbung

Die Schnitte wurden 3 mal mit PBS gewaschen und zur Epitopdemaskierung bei 37°C 10 Min mit 0,05% Protease XXIV und nach dreimaligen Waschen weitere 90 Min in PBS bei 37°C mit 0,1% Hyaluronidase behandelt. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden bei RT 20 min in 10% Ziegen Serum (normal goat serum; NGS) geblockt. Zur Verdünnung der primären Antikörper (siehe 2.1.6) wurde 1% NGS verwendet, die Lösung wurde auf die Präparate gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgten drei 5-minütige Waschschrte in PBS, anschließend wurden die sekundären Antikörper in geeigneter Verdünnung (siehe 2.1.7) in 1% NGS 1h bei 37°C auf den Schnitten inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS gespült. Wie zuvor beschrieben, wurden die Kerne mit DAPI angefärbt und die Präparate eingedeckt. Bildaufnahmen wurden mit dem Olympus BX61 Mikroskop in 40-facher Vergrößerung angefertigt.

3.2.21.2 Immunhistochemische Färbungen

Alzianblau und Siriusrot Färbung

Die Präparate wurden wie angegeben entparaffiniert und rehydriert, jedoch wurde für die Alzian blau/Siriusrot Färbung keine Blockierung der endogenen Peroxidase durchgeführt. Nach dem 5-minütigen Waschschrte in PBS wurden die Zellkerne 15 Min in Weigert's Hämatoxylin gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte 5 Min in Aqua dest. gewaschen und für weitere 10 Min unter

laufendem Leitungswasser gespült. Die Objektträger wurden 3 Min in 3% Essigsäure, danach 30 Min in Alzianblau-Färbelösung inkubiert und nochmals 10 Min unter laufendem Leitungswasser gespült. Es folgte eine 1-stündige Inkubation in 0,1% Siriusrot-Färbelösung, gefolgt von 2 Min Inkubation in 0,01M HCl um ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach einem Waschschrift in Aqua dest. und einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%, 99% EtOH je 5 Min) wurden die Schnitte 2x10 Min in Rotihistol gelagert und abschließend mit dem Roti®-Histokitt eingedeckt.

Kollagen X- und Runx2 Färbung

Es wurden ein in der Maus hergestellter Antikörper gegen Kollagen X sowie ein Maus-anti-RUNX2 Antikörper zusammen mit dem Dako ARK™ Animal Research Kit verwendet. Um Kollagen X positive Zellen anzufärben wurde wie unter Punkt 2.2.21.1 beschrieben eine Epitopdemaskierung mit Protease XXIV und Hyaluronidase durchgeführt und die Schnitte anschließend 3 mal mit PBS gespült. Die Inkubation mit den primären Antikörpern (Verdünnungen siehe 2.1.6) sowie die weitere Färbeprozedur wurden nach den Herstellerangaben des Dako ARK™ Animal Research Kit durchgeführt. Die Schnitte wurden abschließend in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 96%, 99%, 2 x Rotihistol, jew. für 10 Min) dehydriert und mit Roti® Histokit eingedeckt. Übersichtsbilder der Färbungen wurde mit dem Olympus BX61 Mikroskop in 20-facher Vergrößerung erstellt.

3.2.22 Färbungen der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase

Zur Färbung der TRAP wurde der *Acid Phosphatase, Leukocyte* (TRAP) Kit verwendet. Die Färbelösung wurde nach Herstellerangaben erstellt und bei 37°C gelagert.

Zum Anfärben der Osteoklasten in den 96-Well Platten wurde das Medium nach 5 Tagen Differenzierung abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1h bei 37°C in der Färbelösung im Inkubator gelagert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und nach einem abschließenden Waschschrift mit Aqua dest. wurden Übersichtsaufnahmen der Wells mit dem TissueFAXSi plus System (Tissue Gnostics, Wien, Österreich) bei 10-facher Vergrößerung erstellt. Die Zellzahl pro Well konnte mit Hilfe der Adobe Photoshop CS4 Software (Adobe Sysmtes GmbH, München, Deutschland) bestimmt und verglichen werden. Die Zellzahl der WT-Kontrollen wurde jeweils auf 100% gesetzt, die Zellzahlen der Osteoklasten aus SyX- und Tac1-/- Mäusen wurden auf die WT-Kontrollen kalibriert.

Die Paraffinschnitte wurden erst gründlich mit Aqua dest. gespült, dann in einem geeigneten Gefäß 1 h bei 37°C in der Färbelösung lichtgeschützt inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift in Aqua dest. wurden die Präparate getrocknet und Übersichtsbilder der Schnitte mit dem TissueFAXSi plus System bei 10-facher Vergrößerung erstellt.

3.2.23 Morphometrische Analysen der Frakturkalli

3.2.23.1 Bestimmung des mesenchymalen, knorpeligen und kalzifizierten Gewebes im Frakturkallus

Es wurden jeweils 3 Paraffinschnitte von jeder frakturierten Tibia zur Analyse ausgewählt. Der Abstand der einzelnen Paraffinschnitte voneinander betrug 150 µm. Die Schnitte wurden wie in Abschnitt 2.2.21.2 beschrieben, mit Alzianblau, Siriusrot und Weigert's Hämatoxylin angefärbt. Mit einem Olympus Mikroskop wurden mit 20-facher Vergrößerung Übersichtsbilder aufgenommen, die mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop CS4 und einem Bamboo Graphic Pad (Bamboo Fun S Pen & Touch, Wacom Europe GmbH, Krefeld, Deutschland) analysiert wurden. Der gesamte Kallus (Abb.: 14, grün umrandet) wurde markiert und dessen Pixelzahl bestimmt. Diese wurde jeweils als 100% gesetzt. Anschließend wurde an Hand der Färbung und der Zellmorphologie zwischen mesenchymalem, knorpeligem (Soft-; blau gefärbt), und kalzifiziertem (rot gefärbt) Kallusgewebe und Färberelikten (FR; freie Stellen, Gewebeverlust auf Grund des Färbeprozesses, hellblau) unterschieden (siehe Abb. 14). Kalzifizierte Bereiche waren deutlich durch eine starke Rotfärbung und der typischen Struktur von verknöchertem Gewebe erkennbar (Abb.: 14, gelb umrandet). Tiefblau gefärbte Bereiche zeigten eine deutliche Knorpel-Matrix (Färbung der Glykosaminoglykane im Knorpelgewebe), die von den darin liegenden Chondrozyten gebildet worden war (Abb.: 14, rot umrandet). Die Chondrozyten zeigten eine deutlich rundere Morphologie im Vergleich zu den Zellen im hellblau gefärbten mesenchymalen Kallusgewebe (Abb.: 14, grau umrandet), die sich durch ein längliche Zellmorphologie auszeichneten. Die Bereiche „knorpeliger Kallus“, „kalzifizierter Kallus“ und „Färberelikte“ wurden markiert und die Pixelanzahl bestimmt. Hierdurch konnte der jeweilige Anteil am gesamten Kallus rechnerisch ermittelt werden. Der übrige Bereich wurde als „mesenchymaler Kallus“ definiert und durch Subtraktion der ermittelten Anteile (weiches, kalzifiziertes Gewebe, FR) vom gesamten Kallus (100%) errechnet.

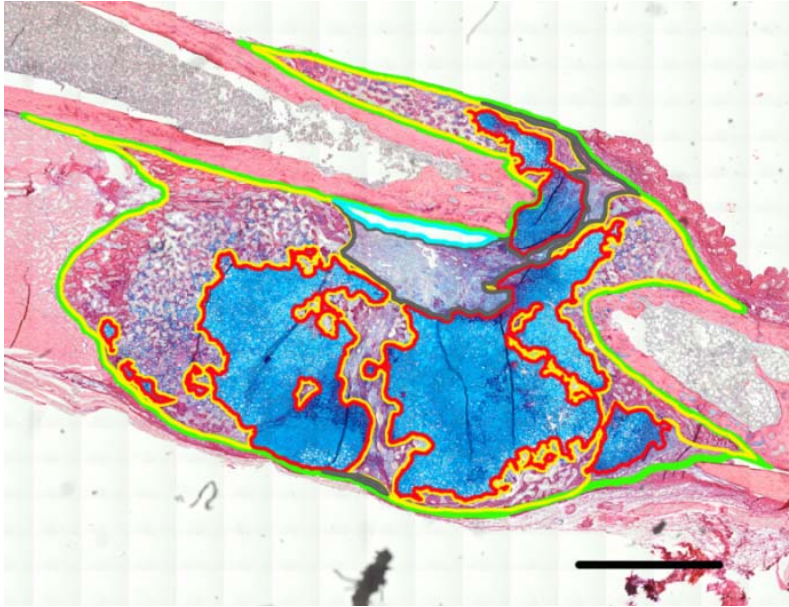


Abbildung 14: Übersichtsbild eines Frakturkallus (Paraffinschnitt) einer Tac1^{-/-} Maus 13 Tage nach Fraktur. Mit einem Bamboo Graphic Pad (Wacom) und der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop CS4 wurden der gesamte Kallus (grün), das knorpelige (blau) und knöcherne (gelb) Kallusgewebe sowie leere Bereiche (Färbereликte, hellblau) umrandet, markiert und die Pixelzahl bei immer gleicher Vergrößerung bestimmt. Dadurch konnte der Anteil des knorpeligen und knöchernen Gewebes am gesamten Kallus ermittelt werden. Die Fläche des restlichen Kallusgewebes wurde rechnerisch ermittelt und als mesenchymaler Kallus definiert (grau). Maßstab = 1mm.

3.2.23.2 Bestimmung des Anteils hypertropher Chondrozyten im Softkallus

Um den Anteil der hypertrophen Chondrozyten im gesamten Frakturkallus zu bestimmen wurde ein Antikörper gegen Kollagen X verwendet (Färbung siehe Abschnitt 3.2.21.2). Für den Färbeprozess wurden Paraffinschnitte (13 Tage nach Fraktur) ausgewählt, die jeweils direkt auf die Paraffinschnitte folgten (Serienschnitte) die in der zuvor beschriebenen Alzianblau/Siriusrot Färbung verwendet wurden. Mit den gefärbten Schnitten wurden ebenfalls Übersichtsaufnahmen mit dem Olympus BX 61 Mikroskop in 20-facher Vergrößerung hergestellt. Kollagen X positive Bereiche sind durch eine dunkelbraune Färbung zu erkennen und wurden mittels Bamboo Graphic Pad (Wacom) gekennzeichnet um die Pixelzahl zu ermitteln. Die Pixelzahl der Fläche des knorpeligen Kallusgewebes aus den Alzianblau/Siriusrot Färbungen wurde als 100% gesetzt um den Anteil der Fläche, die von hypertrophen Chondrozyten im weichen Kallusgewebe eingenommen wird, zu errechnen. Zur graphischen Darstellung wurden die Ergebnisse der WT-Kontrollen auf 100% gesetzt und die Resultate der SyX- und der Tac1^{-/-} Tiere auf die WT-Kontrollen kalibriert.

3.2.23.3 Bestimmung der Osteoklastenanzahl im kalzifizierten Kallusgewebe

Die für Osteoklasten typische TRAP wurde, wie unter 2.2.22 beschrieben, angefärbt. So konnte die Anzahl der Osteoklasten 13 Tage nach dem Setzen der Fraktur im kalzifizierten Kallusgewebe bestimmt werden. Mit dem TissueFAXSi plus System wurden Übersichtsbilder der Färbungen in 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Fläche der kalzifizierten Bereiche in den Kalli wurde unter Benutzung der HistoQuest Software als „region of interest“ (ROI) definiert und die Größe wurde von der Software direkt als Fläche in mm² angezeigt. Die Anzahl der TRAP positiven Osteoklasten innerhalb der festgelegten ROIs wurde gezählt. Durch Division wurde die Anzahl der Osteoklasten/mm² berechnet.

3.2.23.4 Bestimmung der Osteoblastenanzahl im gesamten Kallus

Das Protein RUNX2 ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung. Um die Anzahl an Osteoblasten im Kallus zu ermitteln wurden die Paraffinschnitte der Frakturkalli wie unter [3.2.21.2](#) beschrieben mit einem Antikörper gegen RUNX2 angefärbt. Es wurden jeweils 10 Bilder aus unterschiedlichen Regionen im Kallus mit einem konfokalen Mikroskop (Nikon C1, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) in 60-facher Vergrößerung und unter Verwendung von Immersionsöl erstellt. Die Zahl der RUNX2-positiven Zellen wurde ermittelt, die Werte der WT-Kontrollen wurden auf 100% gesetzt, die Ergebnisse der SyX- und der Tac1-/- Tiere auf die WT-Kontrollen kalibriert.

3.2.24 Biomechanische Analysen

Das Setzen der stabilen Femurfrakturen wurden von Dr. med. Richard Stange (vom Universitätsklinikum Münster) im Tierlaboratorium H4 des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt, wo die Tiere für weitere 21 Tage gehalten wurden und die abschließende Präparation der frakturierten und unfrakturierten Beine erfolgte. Nach der Präparation wurden die Proben an Dr. Stange und Dr. Britta Wieskötter, Lehrstuhl für Unfallchirurgie, nach Münster versandt, die biomechanischen Tests fanden am Universitätsklinikum Münster statt.

Die bei -20°C gelagerten Präparate (frakturierte und nicht-frakturierte Femora) wurden bei 4°C über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und die zur Stabilisierung verwendeten Injektionsnadeln vorsichtig entfernt. Es wurden Einbettsockel und eine Torsionstestmaschine verwendet, die in den Fein- und

Elektromechanischen Forschungswerkstätten des Universitätsklinikums in Münster hergestellt worden waren (Abb. 15 A).

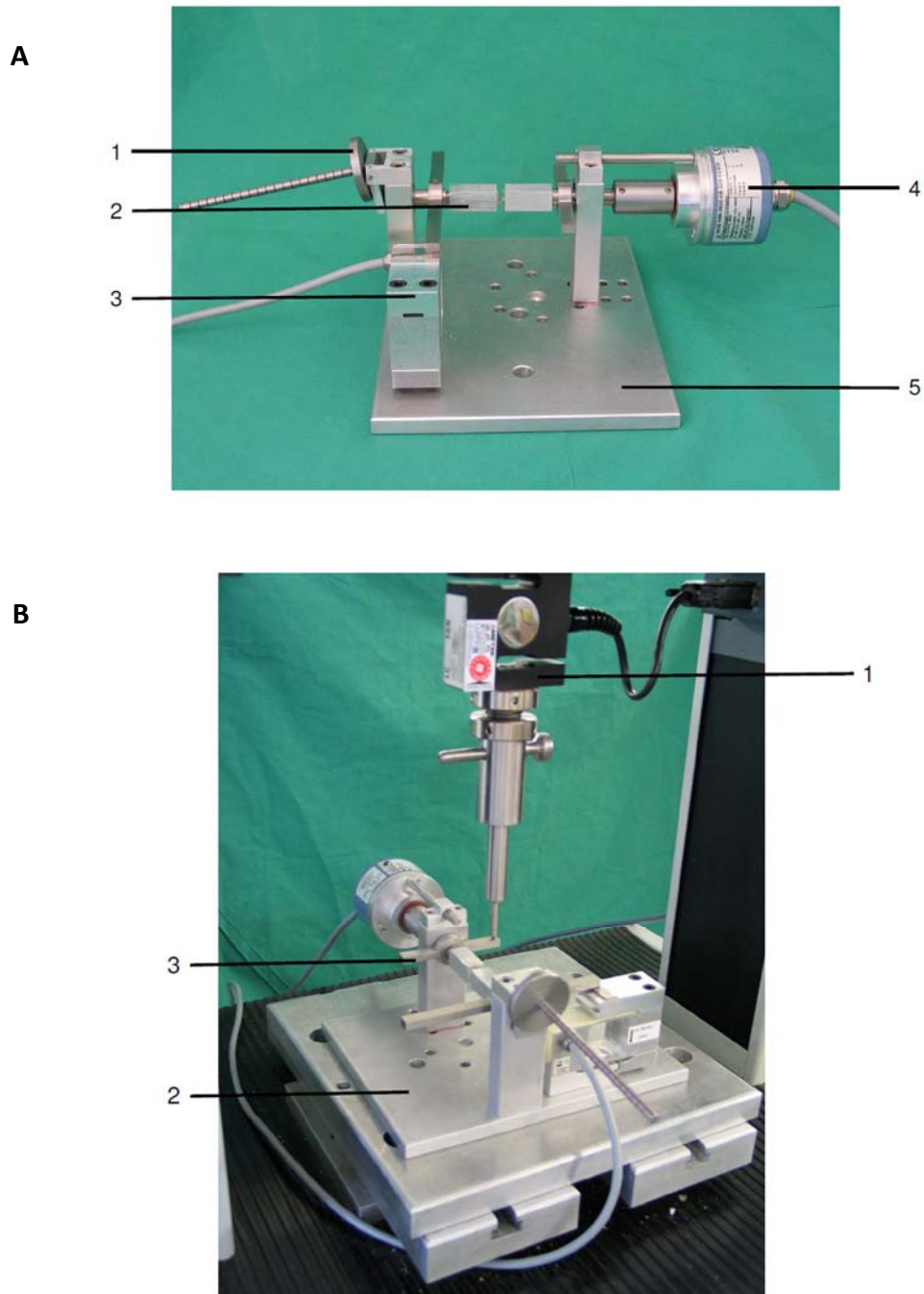


Abbildung 15: Aufbau der Biomechanischen Test-Apparatur. (A) Torsionstestmaschine. 1. Vorlast; 2. Einbettsockel; 3. Kraftaufnehmer; 4. Drehgeber; 5. Bodenplatte. (Fein- und Elektromechanische Forschungswerkstätten am Universitätsklinikum Münster) (B) Kombination der Torsionstestmaschine mit dem Materialprüfsystem LR5K Plus. 1. Materialprüfsystem; 2. Torsionstestmaschine; 3. Hebelarm. Modifiziert nach Everding (2013).

Die Femora wurden in zentraler, senkrechter Lage jeweils am distalen und proximalen Femurende mittels Knochenzement in Einspannschlitten fixiert so dass der Knorpel auf den Kondylenflächen des Kniegelenks nach anterior ausgerichtet war. Der Einbettsockel wurde längs, parallel zur Rotationsachse zwischen dem Kraftaufnehmer und dem Drehgeber der Torsionstestmaschine eingespannt. Die Torsionstestmaschine wurde in Verbindung mit der zweiseitigen Tischprüfmaschine LR5K Plus (AMETEK GmbH, Meerbusch, Deutschland) verwendet (Abb. 15 B). Um die Zugbelastung zu minimieren, die während des Tests durch Längenveränderungen entsteht, wurde eine axiale Vorlast von 0,4 N auf die Femora ausgeübt. Nachdem der Einspannschlitten entfernt worden war, wurde der Ausgangspunkt der Tischprüfmaschine bestimmt. Anschließend wurde durch die Tischprüfmaschine LR5K Plus eine konstante Geschwindigkeit von 2 mm/Min erzeugt, die auf einen Hebelarm der Torsionsmaschine übertragen wurde. Die Torsionsmaschine wandelte diese Kraft in eine Drehbewegung um. Das Torsionsmoment in Nmm und der Torsionswinkel (in rad) beim Brechen der Femora wurde mit Hilfe der PC Messelektronik Spider 8 und dem Softwareprogramm Catman[®] 4.5 (beides von HBM, Darmstadt) gemessen und festgehalten. Durch weitere Berechnungen in einer Microsoft Excel[®] Tabelle wurde der maximale Torsionswinkel in Grad [°] und die Steifigkeit in [Nmm/°] ermittelt. Die Ergebnisse der frakturierten Femora wurden anschließend ins Verhältnis zu den Werten der jeweiligen kontralateralen, nicht-frakturierten Femora gesetzt um ebenfalls eine Aussage über die mechanische Belastbarkeit des neu gebildeten Knochens treffen zu können (Everding 2013).

3.2.25 μ Ct – Analysen

Die Frakturen wurden von Dr. med. Hans-Robert Springorum von der Klinik und Poliklinik für Orthopädie der Universitätsklinikums Regensburg gesetzt. Nach der Präparation wurden die Proben an Dr. Volker Kuhn an die Universitätsklinik für Unfallchirurgie in Innsbruck verschickt, wo die μ Ct Analysen sowie die Auswertungen durchgeführt wurden.

21 Tage nach Setzen der Stabilisierten Frakturen wurden die frakturierten sowie die kontralateralen nicht-frakturierten Femora präpariert und in gefrorenem Zustand nach Innsbruck verschickt. Dort wurde der zur Stabilisierung verwendete Metall-Pin entfernt, um Artefakte in den gescannten Bildern zu vermeiden. Die gefrorenen Femora wurden dann im vivaCT40 Mikrocomputertomographie System der Firma Scanco Medical AG (Brüttsellen, Schweiz) gescannt. Hierfür wurden verschiedene „*volumes of interest*“ (VOIs) gesetzt (Abb. 16), zum einen der Frakturkallus zum anderen ein Bereich proximal zum Kallus gelegen. Dieser wurde gewählt, da ein Scan im kortikalen Knochen auf Grund der

Material und Methoden

Fraktur (Markraum durch Metall-Pin nicht mehr in ursprünglichem Zustand und stark unterschiedliche Kallusgröße) keine korrekten Ergebnisse erzielen würde. Dieser proximale Bereich wurde ebenso in unfrakturierten, kontralateralen Beinen gescannt. Es wurde eine isotrope Nominalauflösung von 12,5 μm verwendet. Die Röntgenröhre wurde mit einer Einheit von 70 kVp und 114 μA , einer Integrationszeit von 380 ms und 1000 Projektionen betrieben. Bei den erstellten Bildern wurde anschließend ein Gauß Filter mit den Einstellungen Sigma = 1.2 und Support = 1 Voxel verwendet. Mit einem globalen *threshold* von 22,4 % des maximalen Grau-Wertes wurden die Bilder segmentiert (Müller and Rügsegger 1997). Dieser Prozess wurde an allen zu analysierenden VOIs durchgeführt. Zur Auswertung der Bilder wurde die Hersteller-eigene Software verwendet und eine direkte 3D-Einstellung hierfür gewählt. Die folgenden dreidimensionalen Parameter wurden durch Verwendung einer direkten 3D Annäherung (Hildebrand et al. 1999) herangezogen um eine Aussage über die Knochenstruktur treffen zu können:

- Trabekelanzahl (Tb.N; 1/cm)
- Trabekeldicke (Tb.Th; mm)
- Trabekelabstand (Tb.Sp, mm)
- Konnektivität (Conn.D; 1/mm³)
- Knochendichte (BV/TV)

Wie schon für die biomechanischen Tests wurden auch hier die proximal zur Fraktur gelegenen Bereiche in den frakturierten Femora ins Verhältnis zu den proximalen Bereichen der jeweiligen kontralateralen Femora gesetzt und prozentual dargestellt.



Abbildung 16: Darstellung der Volumes of interests (VOIs), welche für die μ Ct Analysen verwendet wurden. Die Abbildung zeigt einen linken, frakturierten Femur einer Tac1-/- Maus, der repräsentativ die Platzierung der VOIs darstellen soll. Der Frakturkallus wurde als VOI analysiert sowie ein weiterer proximal/trochantär gelegener VOI, der auch in den kontralateralen, nicht-frakturierten Femora untersucht wurde, um die Unterschiede zwischen dem Knochengewebe der frakturierten und der kontralateralen, nicht-frakturierten Femora zu analysieren. Von links nach rechts: posteriore, laterale, frontale und mediale Ansicht. Dunkelgraue Bereiche zeigen die festgelegten VOIs. Messbalken = 1 mm

3.2.26 Statistische Analysen

Alle Daten werden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Die GraphPad Prism 5.0 Software wurde zur Auswertung der statistischen Analysen verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte wurden an Hand des zwei-seitigen Mann-Whitney U-Tests und des *One-way* ANOVA Tests ermittelt. Wurden die WT-Kontrollen auf 100% oder im Falle der Genexpressionsanalysen auf "0" gesetzt, um die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und den WT-Kontrollen darzustellen, wurde der *Wilcoxon signed-rank* Test zum Berechnen signifikanter Unterschiede verwendet.

4. Ergebnisse

Um den Einfluss des sensiblen und sympathischen Nervensystems auf die Frakturheilung zu untersuchen, wurden *in vivo* Analysen mit Tac1-defizienten und chemisch sympathektomierten (SyX) Mäusen durchgeführt. Zusätzlich wurden *in vitro* Experimente mit primären Zellkulturen und Explantatkulturen durchgeführt, um zu untersuchen, durch welche Veränderungen auf zellulärer Ebene die zuvor erhaltenen Erkenntnisse verursacht werden könnten.

4.1 *In vivo* Analysen

4.1.1 Unterschiede im Bewegungsverhalten von SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen

Die Frakturheilung wird maßgeblich durch Zug-, Scher- und Druckkräfte, die durch Bewegung auf den Knochen und die Frakturrenden ausgeübt werden, beeinflusst (Claes and Heigele 1999). Die gezielte Deletion des Neurotransmitters Substanz P (SP) und die chemische Inhibition des sympathischen Nervensystems in der Peripherie könnten das Verhalten der Mäuse hinsichtlich der Mobilität und der Bewegungsgeschwindigkeit verändert haben. Unterschiede im Bewegungsverhalten, die bereits vor dem Setzen der Frakturen vorhanden wären, würden den Heilungsprozess der Fraktur zusätzlich beeinflussen. Aus diesem Grund wurde das Bewegungsverhalten von SyX- und Tac1-/- Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp (WT)-Kontrolltieren jeweils ohne Fraktur untersucht. Für den Test wurden Mäuse der drei Stämme einzeln in Käfige gesetzt und mit Hilfe einer Kamera und der Ethovision X7 Software die im Verlauf von 60 Minuten zurückgelegte Strecke [cm] und die durchschnittliche Geschwindigkeit [cm/Sek] ermittelt.

Wie aus Abb. 17 hervorgeht, gibt es keine signifikante Veränderung bezüglich der binnen 60 Min zurückgelegten Gesamtstrecke (Gesamtdistanz) zwischen SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrolltieren. Ebenso konnte keine signifikante Veränderung in der Geschwindigkeit festgestellt werden, mit der sich die Mäuse während der 60 Min durchschnittlich bewegt haben. Es kann daher von einem ähnlichen Bewegungsverhalten vor dem Setzen der Frakturen ausgegangen werden.

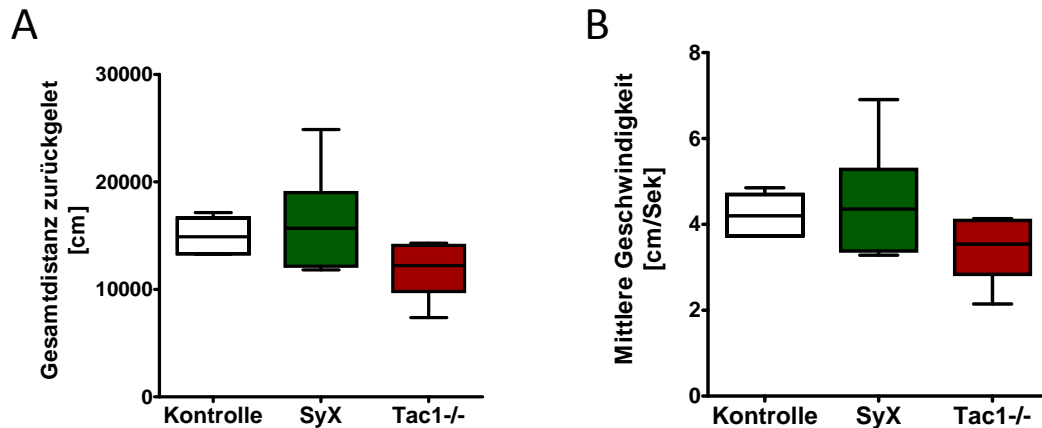


Abbildung 17: Das Bewegungsverhalten von SyX- und Tac1-/- Mäuse verglichen mit den WT-Kontrolltieren. (A) zeigt die Gesamtdistanz, die binnen 60 Min von den Mäusen im neuen Käfig zurückgelegt worden war. (B) zeigt die mittlere Geschwindigkeit, mit der sich die Mäuse während der 60 Min fortbewegt haben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, n= 6.

4.1.2 Unterschiede in der Berührungssensibilität von SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen

Der sensible Neurotransmitter SP spielt bei der Signalübertragung mechanischer Schmerzreize und während Entzündungsreaktionen eine große Rolle. Aber auch das sympathische Nervensystem kann die Schmerzempfindung durch pro- und antiinflammatorische Einflüsse auf Entzündungsreaktionen verändern (Harrison and Geppetti 2001, Straub et al. 2006). Unterschiedliches Schmerzempfinden könnte zu einer veränderten Belastung der frakturierten Beine zwischen den Mausstämmen und somit zu Unterschieden in der Frakturheilung führen.

Das Schmerzempfinden kann anhand der Berührungssensibilität gemessen werden, daher wurde der Dynamic Plantar Aesthesiometer Test der Firma Ugo Basile (Comerio VA, Italien) verwendet, um die Berührungssensitivität in den nicht-frakturierten und frakturierten Beinen der Mäuse zu vergleichen. Die Mäuse wurden auf ein Gitter in getrennte Kompartimente gesetzt. Mit einem stumpfen Filament wurde eine steigende Kraft [Gramm] auf die Sohle der Pfoten ausgeübt. Die vom Filament aufgebrachte Kraft im Moment, in dem die Mäuse die Berührung als unangenehm empfanden bzw. die Empfindung von Schmerz eintrat und sie die Pfoten zurückzogen, wurde festgehalten.

Die Berührungssensibilität der nicht-frakturierten, kontralateralen Beine (rechts) wurde zwei Tage vor und direkt vor dem Setzen der Frakturen sowie 5 und 8 Tage nach dem Setzen der Frakturen untersucht, um zu testen, ob SyX- und Tac1-/- Tiere eine veränderte Berührungssensibilität im Vergleich zu den WT-Kontrollen aufweisen. Wie aus der Abb. 18 A hervorgeht, zeigten SyX- und Tac1-/- Mäuse verglichen mit den WT-Kontrollen das gleiche Berührungsempfinden in nicht-

Ergebnisse

frakturierten Beinen vor (Tag 0) und auch 5 bzw. 8 Tage nach Fraktur. Die Berührungssensibilität frakturierter Beine (links) wurde ebenfalls zwei Tage vor und direkt vor dem Setzen der Frakturen gemessen und auch hier konnten keine Unterschiede bezüglich des Schmerzempfindens zwischen den Mausstämmen festgestellt werden (Abb. 18 B). Die Messungen 5 Tage nach Fraktur ergaben ein signifikant reduziertes Berührungsempfinden in Tac1^{-/-} Mäusen verglichen zu den WT-Kontrollen und den SyX-Mäusen. Das Berührungsempfinden von Tac1^{-/-} Mäusen unterschied sich 8 Tage nach Fraktur nicht mehr von dem der WT-Kontrollen. Zum Zeitpunkt 8 Tage nach Fraktur zeigten jedoch SyX-Mäuse ein signifikant geringeres Schmerzempfinden im Vergleich zu den WT-Kontrollen und den Tac1^{-/-} Mäusen (Abb. 18 B). Der Test zeigte, dass das sensible und das sympathische Nervensystem die Berührungssensibilität in den Extremitäten nach einer Fraktur zu unterschiedlichen Zeitpunkten beeinflussen.

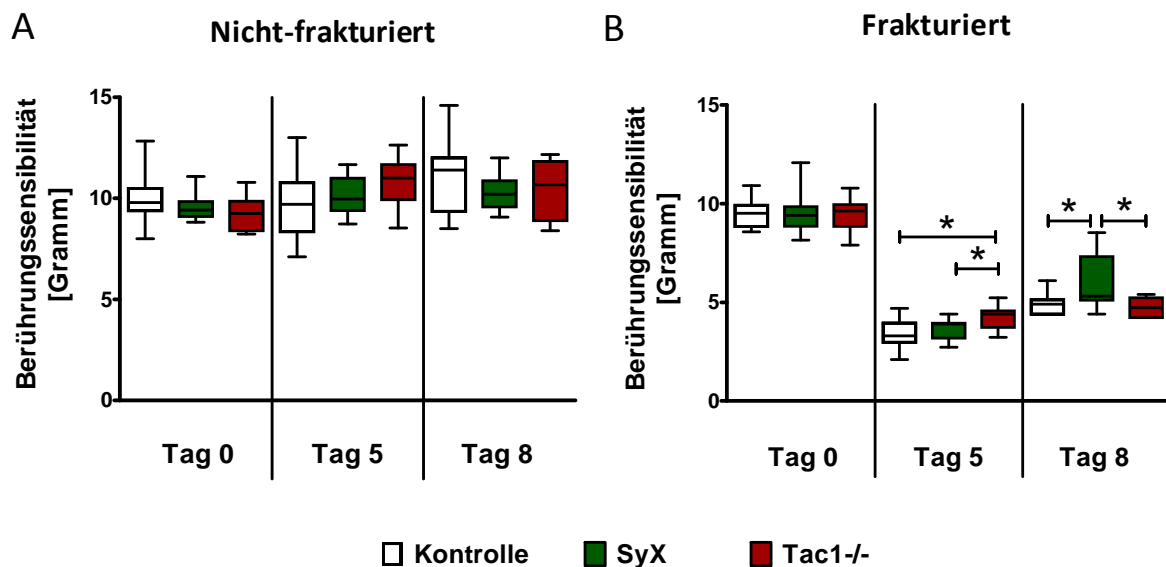


Abbildung 18: Berührungssensibilität [in Gramm] von SyX- (n=12) und Tac1^{-/-} (n=15 für Tag 0, 5; n=7 für Tag 8) Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren (n= 10) 0, 5 und 8 Tage nach Fraktur in nicht-frakturierten, kontralateralen Beinen (A) und frakturierten Beinen (B). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; * = p≤0,05.

4.1.3 Vermessung des Frakturkallus – Bestimmung von Gewicht, Volumen und Dichte

Um den Einfluss der fehlenden SP-vermittelten Signalübertragung und der chemischen Inhibierung des sympathischen Nervensystems auf die Entwicklung des Frakturkallus zu analysieren, wurde die Größe des entstandenen Kallus 8 Tage nach Fraktur ermittelt. Der Frakturkallus hat zu diesem Zeitpunkt (Tag 7-9 nach Fraktur) das größte Volumen im Verlauf des Heilungsprozesses. SyX, Tac1^{-/-}

Mäuse und WT-Kontrollen wurden 8 Tage nach Fraktur euthanasiert und die Frakturkalli an den linken Femora präpariert um die Höhe, Breite und Tiefe der Kalli zu vermessen. Das Volumen wurde unter Verwendung der Formel für ellipsoide Körper (Definition der Höhe, Breite und Tiefe und Formel: siehe [3.2.5](#)) berechnet. Anschließend wurde das Gewicht mit einer Feinwaage bestimmt um dann durch Division des Gewichts durch das Volumen die Dichte zu errechnen.

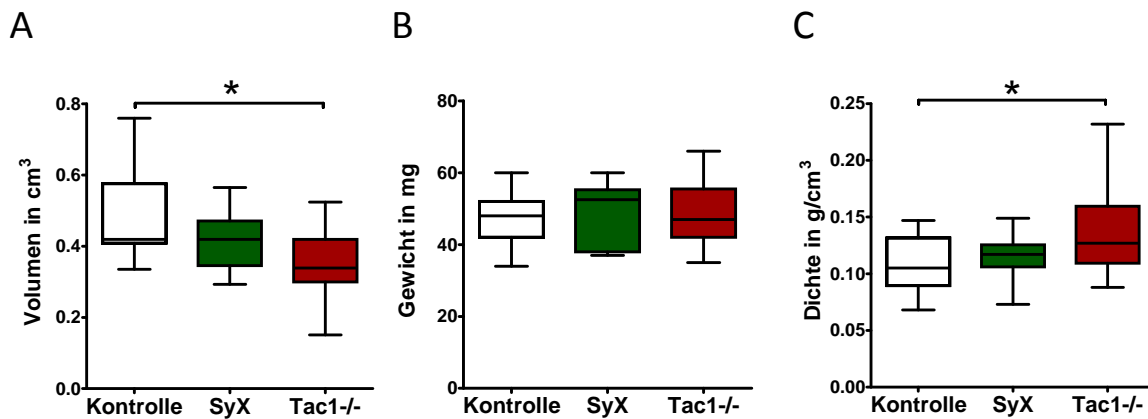


Abbildung 19: Unterschiede des Volumens (A), des Gewichts (B) und der Dichte (C) der Frakturkalli von SyX- (n=12), Tac1-/- (n=22) Mäusen und WT-Kontrollen (n=25). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; * = $p \leq 0,05$.

Das Volumen der Frakturkalli von Tac1-/- Mäusen war 8 Tage nach Fraktur signifikant geringer verglichen mit den WT-Kontrollen, es konnte jedoch kein Unterschied zum Volumen der Frakturkalli von SyX-Mäusen festgestellt werden. Ebenso zeigten Frakturkalli von WT-Kontrollen und SyX-Mäusen ein ähnlich großes Volumen (Abb. 19 A). Die Evaluation des Gewichtes ergab keinen Unterschied zwischen den Frakturkalli von SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen (Abb. 19 B). Die Frakturkalli von Tac1-/- Mäusen hatten eine signifikant höhere Dichte im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren. Die Dichte der Frakturkalli von SyX-Mäusen unterschied sich nicht von der Dichte der Frakturkalli aus Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen (Abb. 19 C). Das sensible Nervensystem ist demnach in der Lage, über den SP-vermittelten Signalweg die Kallusgröße und -dichte zu modulieren. Das sympathische Nervensystem scheint keine Effekte auf die Kallusbildung bezüglich des Volumens und der Dichte auszuüben.

4.1.4 Expression des sensiblen Neurotransmitters SP und dessen Rezeptor NK1 im Frakturkallus von WT-Kontrollen

Die Expression des Neurikinin 1 Rezeptors (NK1R) konnte auf Osteoklasten und Osteoblasten bereits nachgewiesen werden (Goto et al. 1998, Goto et al. 2007, Mori et al. 1999b, Shih and Bernard 1997, Wang et al. 2009). Studien mit primären, kostalen Chondrozyten in Monolayer und 3D Pelletkulturen zeigten, dass die Zellen die Fähigkeit besitzen SP zu produzieren und den NK1R zu exprimieren. Kostale Chondrozyten sind also in der Lage auf einen, durch SP vermittelten, sensiblen Stimulus zu reagieren, möglicherweise durch die eigene Produktion des Neurotransmitters (Opolka et al. 2012). Um festzustellen, ob Chondrozyten und andere Zelltypen auch im Frakturkallus durch das sensible Nervensystem, spezifisch durch den Neurotransmitter SP über dessen Rezeptor NK1, stimuliert werden können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen SP und dem NK1R durchgeführt. Hierfür wurden Paraffinschnitte der Frakturkalli von WT-Kontrolltieren zu den Zeitpunkten 5, 9 und 13 Tage nach Fraktur verwendet (Siehe Abschnitt [3.2.20/3.2.21.1](#)).

Bereits 5 Tage nach Fraktur waren einige mesenchymale Zellen im Frakturkallus zu Chondrozyten differenziert. Wie Abb. 20 zeigt, haben die mesenchymalen Zellen schon früh im Verlauf der Differenzierung zu Chondrozyten begonnen, den Neurotransmitter SP (links, grün) und auch dessen Rezeptor NK1 (Mitte, rot; links, Overlay, gelb) zu produzieren. Im Verlauf des Heilungsprozesses besteht der Kallus 7-9 Tage nach Fraktur zum größten Teil aus knorpeligem Softkallus-Gewebe, zu diesem Zeitpunkt konnte auch eine Vielzahl an SP und NK1R positiven Chondrozyten im Frakturkallus detektiert werden. Der weitere Heilungsprozess zeichnet sich durch die terminale, hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten und der Mineralisierung des Softkallus-Gewebes (Zeitpunkt: 13 Tage nach Fraktur) aus. Wir konnten feststellen, dass sich die Anzahl SP positiver Chondrozyten 13 Tage nach Fraktur wieder reduziert hatte. Hypertrophe Chondrozyten scheinen die Produktion des sensiblen Neurotransmitters SP zu reduzieren, exprimieren jedoch weiterhin NK1R, was aus der Abb. 20, Tag 13 deutlich hervorgeht. Chondrozyten im Frakturkallus produzieren SP endogen und können somit durch SP stimuliert werden. Sie scheinen über den NK1R-vermittelten Signalweg sich selbst und/oder das umliegende Gewebe zu beeinflussen.

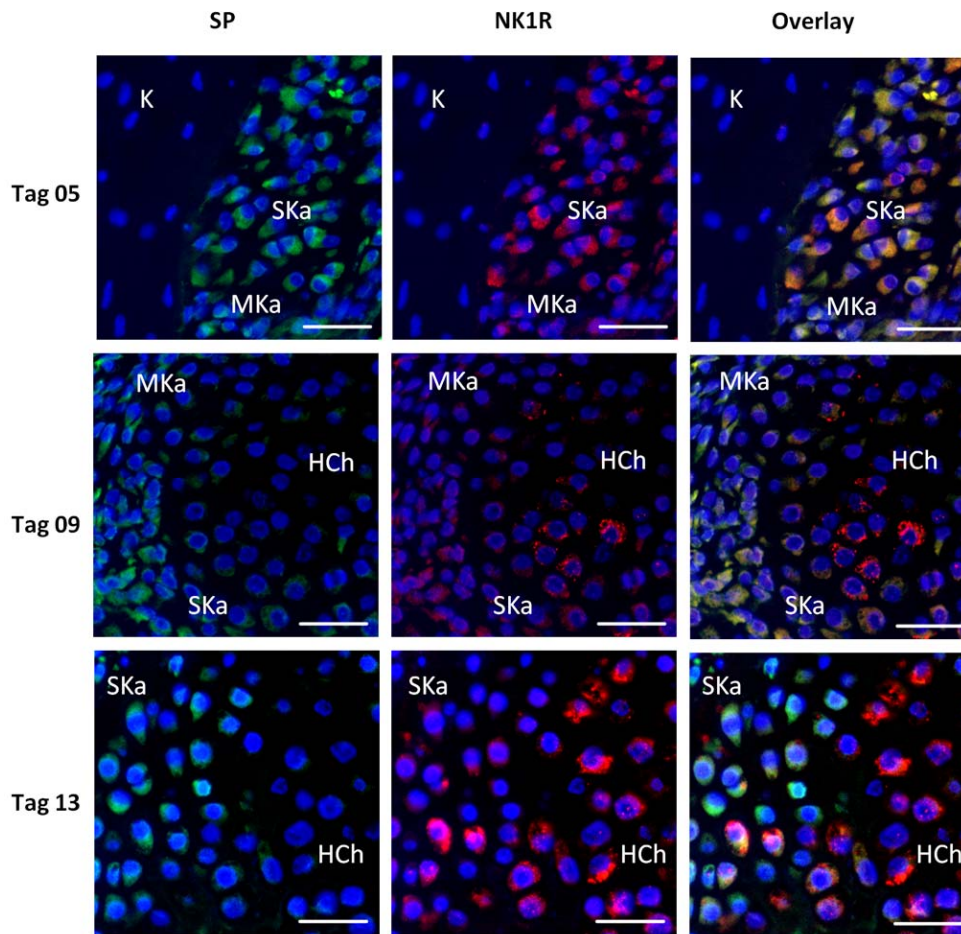


Abbildung 20: Lokalisation des sensiblen Neurotransmitters SP (links, grün) und dessen Rezeptor NK1 (Mitte, rot), sowie die Überlagerung der beiden (rechts, Overlay, gelb), im Frakturkallus von WT-Mäusen zu den Zeitpunkten 5, 9 und 13 Tage nach Fraktur. Zellkerne wurden jeweils mit DAPI angefärbt (blau). K = Knochen, MKa = Mesenchymales Kallusgewebe, SKa = Softkallus, HCh = hypertrophe Chondrozyten, Maßstab = 50 μ m.

4.1.5 Expression des sensiblen Neurotransmitters SP und dessen Rezeptor NK1 im Frakturkallus SyX-Mäuse

Die Expression des Neurotransmitters SP und dessen Rezeptor NK1 wurde ebenso in Frakturkalli von SyX-Mäusen beispielhaft an Tag 5 und 13 nach Fraktur untersucht. Es wurde analysiert, ob die chemische Inhibierung des sympathischen Nervensystems zu einer Veränderung im Neurotransmitter-Milieu und der Lokalisation von SP und dem NK1R führt.

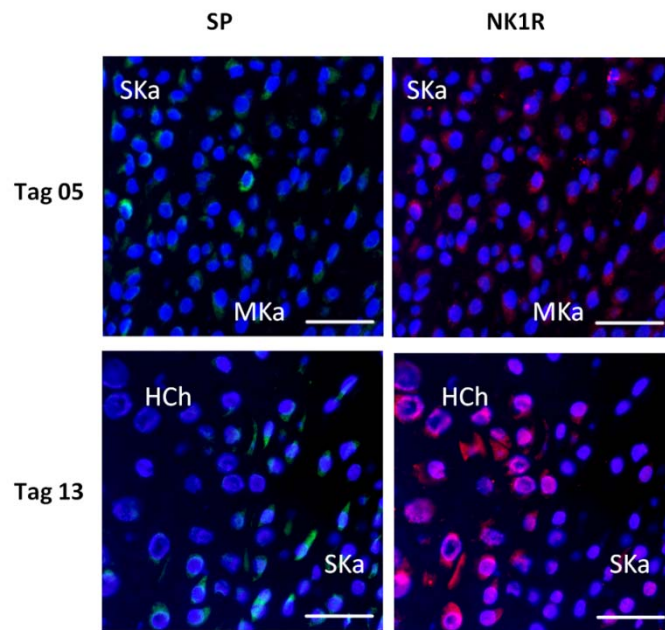


Abbildung 21: Lokalisation des sensiblen Neurotransmitters SP (links, grün) und dessen Rezeptor NK1 (Mitte, rot) im Frakturkallus von SyX-Mäusen an den Zeitpunkten 5 und 13 Tage nach Fraktur. Zellkerne wurden jeweils mit DAPI angefärbt (blau). MKa = Mesenchymales Kallusgewebe, SKa = Softkallus, HCh = hypertrophe Chondrozyten, Maßstab = 50 µm.

In den Frakturkalli von SyX-Mäusen wurde eine ähnliche Färbung detektiert wie in den Frakturkalli der WT-Kontrollen. Die mesenchymalen Zellen produzierten SP und dessen Rezeptor NK1 bereits vor der Differenzierung zu Chondrozyten, wie die Abb. 21 zum Zeitpunkt 5 Tage nach Fraktur zeigt. Auch 13 Tage nach Fraktur konnten noch SP-positive Zellen im Frakturkallus detektiert werden. Die Produktion von SP scheint jedoch auch hier in hypertropen Chondrozyten reduziert zu sein, wohingegen der NK1R noch stark exprimiert wurde. Die Lokalisation und das Expressionsprofil des sensiblen Neurotransmitters SP und dessen Rezeptor NK1 werden durch chemische Sympathektomie mittels 6-OHDA nicht beeinflusst.

4.1.6 Sympathische TH-positive Nervenfasern und AR-Expression auf Zellen im Frakturkallus von WT-Kontrollen

Das sympathische Nervensystem vermittelt seine Effekte über Neurotransmitter, die zur Familie der Katecholamine gehören. Um Katecholamine zu synthetisieren wird das Enzym TH benötigt. Studien mit kostalen Chondrozyten in Monolayer und 3D Pelletkulturen zeigten, dass einige Zellen in der Lage sind TH, sowie einige der adrenergen Rezeptoren (AR) zu exprimieren (Opolka et al. 2012). Auch hier

lag der Fokus der Analysen auf der Expression der AR im knorpeligen Kallusgewebe, die Expression von AR auf Osteoblasten und Osteoklasten wurde schon mehrfach belegt (Arai et al. 2003a, Huang et al. 2009b, Kondo et al. 2013, Nishiura and Abe 2007, Suga et al. 2010a, Togari 2002a).

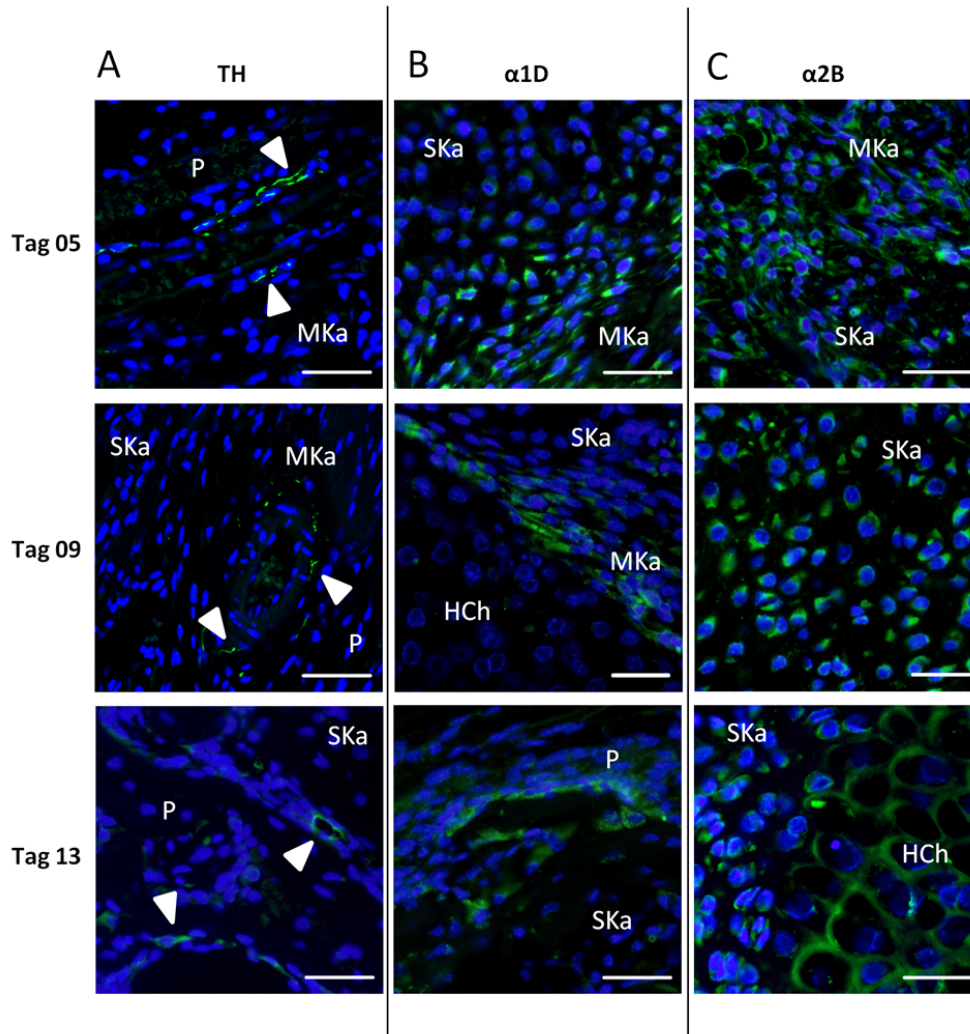


Abbildung 22: Expression der TH (grün, gekennzeichnet durch weiße Pfeile) (A) sowie der $\alpha 1D$ -AR (grün) (B) und $\alpha 2B$ -AR (grün) (C) im Frakturkallus von WT-Mäusen zu den Zeitpunkten 5, 9 und 13 Tage nach Fraktur. Zellkerne wurden jeweils mit DAPI angefärbt (blau). P = Periost, MKa = Mesenchymales Kallusgewebe, SKa = Softkallus, HCh = hypertrophe Chondrozyten, Maßstab = 50 μm .

In den Frakturkalli von WT-Kontrollen konnten keine TH exprimierenden Zellen detektiert werden. TH-positive Nervenfasern waren jedoch schon fünf Tage nach Fraktur im mesenchymalen Kallusgewebe zu finden (Abb. 22 A). Zu den Zeitpunkten 9 und 13 Tage nach Fraktur waren nur noch im Bereich des Periosts TH-positive Nervenfasern auffindbar, der knorpelige Softkallus wurde nicht von TH-positiven Nervenfasern innerviert. Die Abb. 22 B und C zeigen, dass Zellen im Frakturkallus in

Ergebnisse

der Lage sind auf Signale des sympathischen Nervensystems zu reagieren, Zellen im mesenchymalen Kallusgewebe exprimierten 5 und 9 Tage nach Fraktur den $\alpha 1D$ -AR. Im Bereich des Periosts konnten wir über den gesamten Heilungsverlauf bis Tag 13 nach Fraktur $\alpha 1D$ -positive Zellen detektieren, in Chondrozyten im Frakturkallus konnte die Expression des $\alpha 1D$ -AR nicht nachgewiesen werden (Abb. 22 B). Ebenso konnte der $\alpha 2B$ -AR zu den Zeitpunkten 5, 9 und 13 Tage nach Fraktur im mesenchymalen Kallusgewebe detektiert werden. Entgegen dem Expressionsmuster des $\alpha 1D$ -AR wurde der $\alpha 2B$ -AR auch von Chondrozyten exprimiert, diese Eigenschaft bleibt den Chondrozyten im Verlauf der hypertrophen Differenzierung erhalten (Abb. 22 C).

Es wurden weitere Immunfluoreszenzfärbungen zur Detektion des $\beta 2$ -AR durchgeführt, aber es konnten keine $\beta 2$ -AR-positiven Zellen im Frakturkallus während des Heilungsverlaufs bis zum Zeitpunkt 13 Tage nach Fraktur detektiert werden.

4.1.7 Sympathische TH-positive Nervenfasern im Frakturkallus von Tac1^{-/-} Mäusen

Die gezielte Deletion des Neurotransmitters SP könnte Auswirkungen auf die Balance sensibler und sympathischer Nervenfasern im Gewebe haben. Daher wurde die Präsenz TH-positiver sympathischer Nervenfasern auch in den Frakturkalli von Tac1^{-/-} Mäusen untersucht. Immunfluoreszenzfärbungen gegen das Enzym TH zu den Zeitpunkten 5 und 13 Tage nach Fraktur zeigten jedoch keine sichtbaren Unterschiede bezüglich der Häufigkeit und Lokalisation TH-positiver Nervenfasern im Frakturkallus von Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen (Abb. 23).

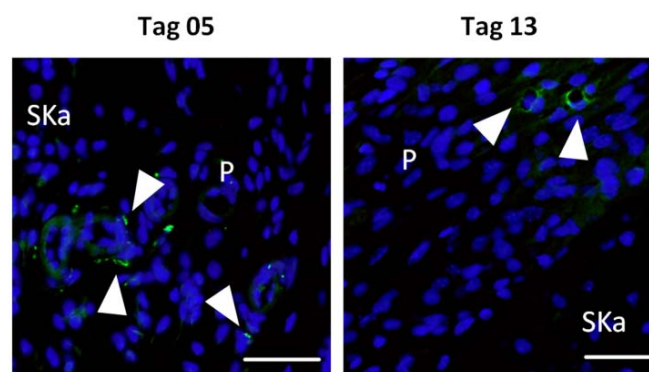


Abbildung 23: Expression der TH (grün, gekennzeichnet durch weiße Pfeile) im Periost von Tac1^{-/-} Mäusen zu den Zeitpunkten 5 und 13 Tage nach Fraktur. Zellkerne wurden jeweils mit DAPI angefärbt (blau). P = Periost, SKa = Softkallus, Maßstab = 50 µm.

4.1.8 Analyse der Gewebezusammensetzung in Frakturkalli von SyX-, Tac1^{-/-}- Mäusen und WT-Kontrollen

4.1.8.1 Prozentuale Verteilung des mesenchymalen, knorpeligen und knöchernen Kallusgewebes im Gesamtkallus während des Heilungsverlauf

Um zu analysieren, welchen Einfluss das Fehlen des sensiblen Neurotransmitters SP und des SNS auf die Bildung der einzelnen Gewebearten im Frakturkallus hat, wurden Alzianblau/Siriusrot Färbungen durchgeführt. Dabei wurde durch Siriusrot das bereits kalzifizierte (verknöcherte) Gewebe in den Frakturkalli rot angefärbt. Mesenchymales Kallusgewebe wurde durch Alzianblau in einem hellen blau angefärbt, knorpeliger Softkallus erhielt durch Alzianblau eine dunkle, intensive Blaufärbung. Durch die Bestimmung der Flächen konnten die jeweiligen Anteile an mesenchymalem, Soft-, und kalzifiziertem Kallusgewebe prozentual zur Gesamtfläche des Frakturkallus (= 100%) bestimmt werden.

Die Abb. 24 A zeigt, dass Frakturkalli von SyX-Mäusen 5 Tage nach dem Setzen der Fraktur einen prozentual höheren Anteil an mesenchymalem Kallusgewebe aufwiesen als Frakturkalli der WT-Kontrollen. Der prozentuale Anteil an knorpeligem Kallusgewebe war in den Frakturkalli SyX-Mäuse hingegen signifikant geringer verglichen mit den WT-Kontrollen. Der Anteil an kalzifiziertem Kallusgewebe unterschied sich zu diesem Zeitpunkt in den Frakturkalli der SyX-Mäuse und der WT-Kontrollen nicht. In der Abb. 24 sind beispielhaft Kalli 5 Tage nach Fraktur von WT-Kontrollen (D), SyX- (E) und Tac1^{-/-}-Mäusen (F) dargestellt. Sie zeigen die Verteilung des mesenchymalen (grau umrandet), knorpeligen (rot umrandet) und knöchernen (gelb umrandet) Kallusgewebes in Bezug auf die Gesamtfläche des Kallus (Grün umrandet).

Die Entstehung des Softkallusgewebes scheint in SyX-Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen erst verspätet einzusetzen dann aber normal abzulaufen. Zwischen der Gewebeverteilung in den Frakturkalli von Tac1^{-/-} Mäusen und WT-Kontrollen konnte 5 Tage nach Fraktur kein Unterschied festgestellt werden.

Die Unterschiede im Anteil an mesenchymalen und knorpeligem Kallusgewebe zwischen SyX-Mäusen und WT-Kontrollen konnten 9 und 13 Tage nach Fraktur (Abb. 24 B und C) nicht mehr nachgewiesen werden. Auch in Tac1^{-/-} Mäusen unterschieden sich die Anteile an mesenchymalem, knorpeligem und knöchernem Kallusgewebe 9 und 13 Tage nach Fraktur nicht von den WT-Kontrollen.

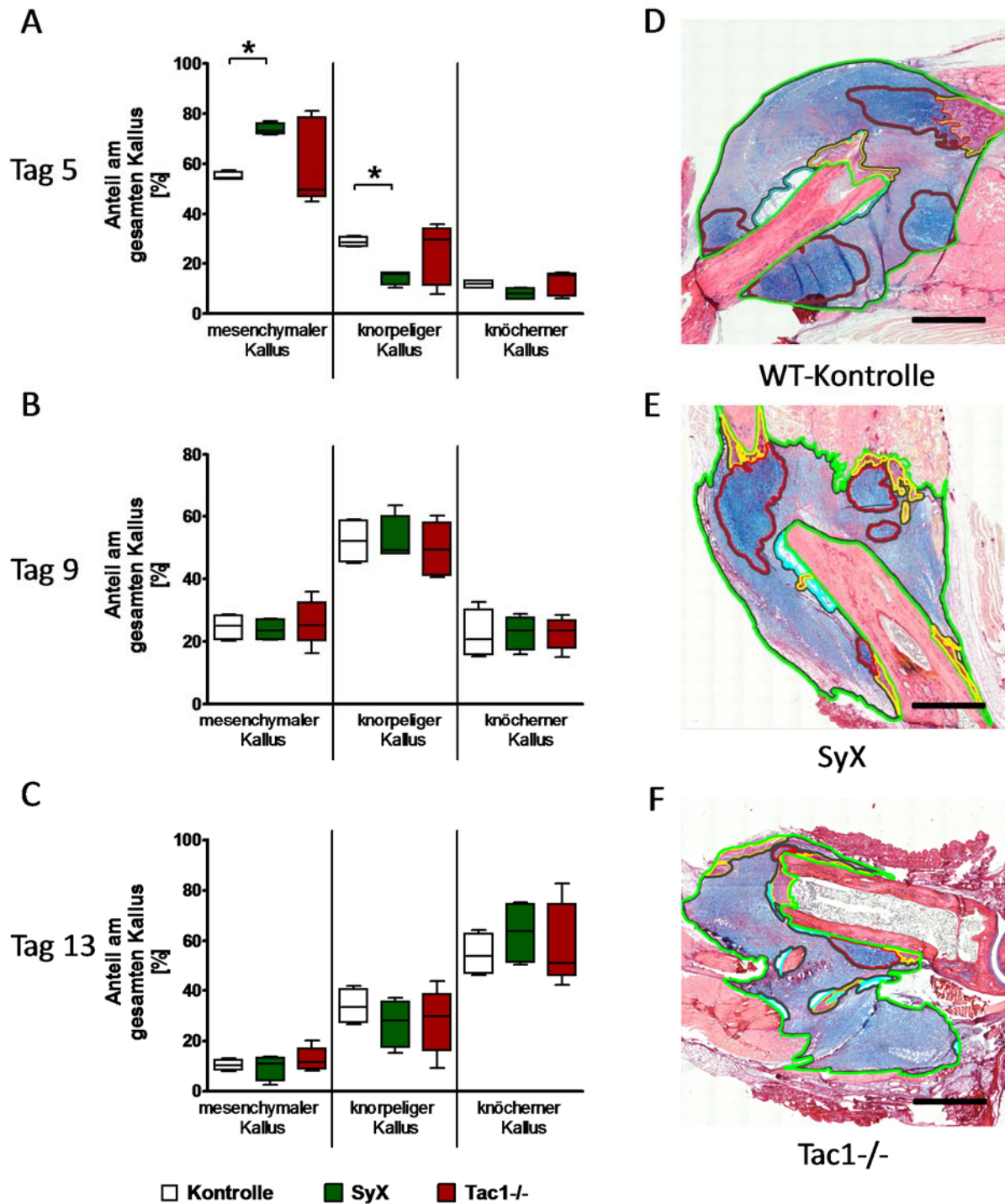


Abbildung 24: Prozentuale Anteile des mesenchymalen, knorpeligen und knöchernen Kallusgewebes am gesamten Kallus (=100%) 5 (A), 9 (B) und 13 (C) Tage nach Fraktur sowie repräsentative Bilder der Alzianblau/Siriusrot gefärbten Kalli zum Zeitpunkt 5 Tage nach Fraktur in WT-Kontrollen (n=4) (D), SyX- (n=4) (E) und Tac1^{-/-} (n=5) Mäusen (F). (A, B, C) Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; * = p<0,05. (D, E, F) und repräsentative Beispielbilder der Alzianblau/Siriusrot Färbungen der Frakturkalli. Markierungen: grün = gesamter Kallus (100%), rot = knorpeliger Kallus, gelb = knöcherner Kallus, grau = mesenchymaler Kallus, hellblau = Gewebeverlust durch Färbeprozedur, Maßstab = 1 mm.

4.1.8.2 Prozentualer Anteil des hypertrophen Knorpelgewebes am gesamten Softkallus-Gewebe

Die hypertrophe Differenzierung der Kallus-Chondrozyten könnte durch das Fehlen von SP und der Inhibierung des SNS beeinflusst werden, daher wurden die Chondrozyten im Frakturkallus mit einem Antikörper gegen Kollagen X angefärbt. So konnte die Fläche, die von hypertrophen Chondrozyten eingenommen wird, prozentual zum gesamten Softkallusgewebe (100%) ermittelt und damit verglichen werden. Der Anteil hypertropher, Kollagen X-positiver Chondrozyten wurde 13 Tage nach dem Setzen der Fraktur analysiert.

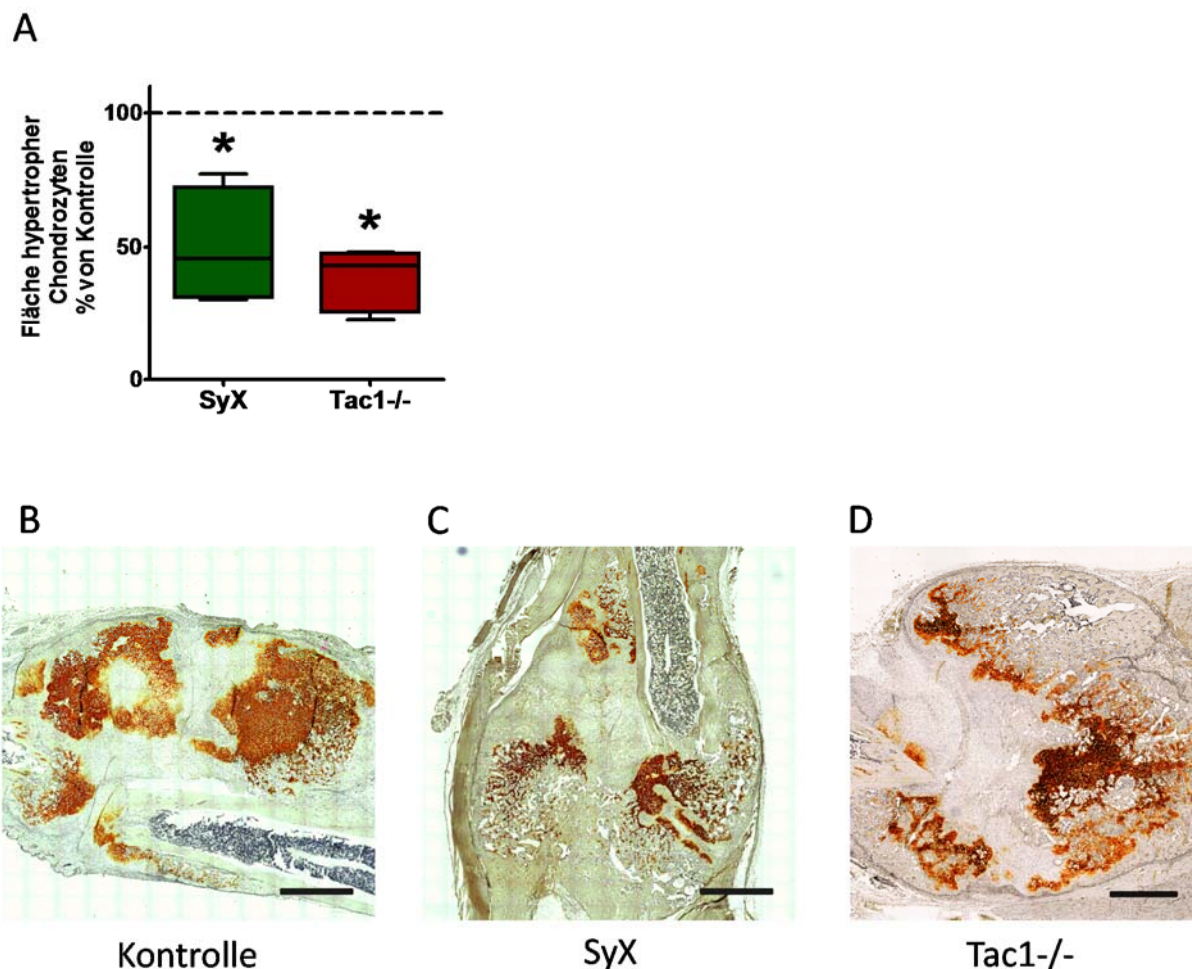


Abbildung 25: Analyse des Flächenanteils Kollagen X-positiver, hypertropher Chondrozyten im Frakturkallus an Tag 13 nach Fraktur von SyX- (n=4) und Tac1^{-/-} (n=5) Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen (n=4), die auf 100% normiert wurden (=100%-Linie). (A) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; * = $p < 0,05$. (B, C, D) Repräsentative Beispielbilder der Kollagen X Färbungen (braun) hypertropher Chondrozyten in den Frakturkalli von WT-Kontrollen (B), SyX- (C) und Tac1^{-/-}-Mäusen (D). Maßstab = 1mm.

Sowohl in SyX-, wie auch in Tac1^{-/-} Mäusen war der prozentuale Anteil an hypertrophen, Kollagen X-positiven, Chondrozyten im knorpeligen Softkallus-Gewebe 13 Tage nach Fraktur signifikant geringer

Ergebnisse

verglichen mit den WT-Kontrollen (Abb. 25 A). Zwischen dem prozentualen Anteil an hypertrophen Chondrozyten im Softkallus-Gewebe von SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen konnte kein Unterschied ermittelt werden. Die Abb. 25 B, C und D zeigen beispielhaft Färbungen der Kollagen X-positiven Bereiche in den Frakturkalli von WT-Kontrollen (B), SyX- (C) und Tac1^{-/-} Mäusen (D) an Tag 13 nach Fraktur. Die Differenzierungsrate zu hypertrophen Chondrozyten im Frakturkallus scheint in SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen verzögert zu sein.

4.1.8.3 Anzahl an Osteoblasten im Kallusgewebe

Der Transkriptionsfaktor RUNX2 ist eines der wichtigsten, Osteoblasten-spezifischen Proteine, welches im Verlauf der Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu reifen Osteoblasten exprimiert wird, daher wurde die Anzahl an Runx2-positiven Osteoblasten in den Frakturkalli 13 Tage nach Fraktur ermittelt.

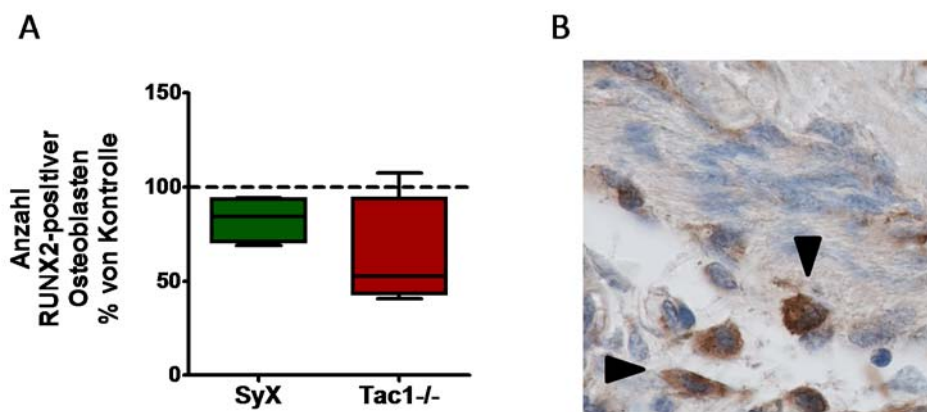


Abbildung 26: Analyse Runx2-positiver Osteoblasten im Frakturkallus an Tag 13 nach Fraktur von SyX- (n=4) und Tac1^{-/-} (n=5) Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen (n=4), die auf 100% normiert wurden (=100%-Linie). (A) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. (B) Repräsentatives Beispielbild der Runx2-positiven Osteoblasten (braun, schwarze Pfeile) im Frakturkallus einer WT-Kontrolle. Vergrößerung: 60X, Mikroskop: Nikon C1 konfokales Mikroskop.

Die Abb. 26 A zeigt die prozentualen Unterschiede der Anzahl an Runx2-positiven Zellen in den Frakturkalli der SyX- und Tac1^{-/-} Mäuse in Bezug auf die WT-Kontrollen, die als 100% gesetzt wurden. Eine SyX scheint keinen signifikanten Unterschied auf die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten auszuüben, wenn verglichen mit den WT-Kontrollen und den Tac1^{-/-} Mäusen. Ebenso konnte auf Grund der hohen Abweichung kein signifikanter Unterschied an Runx2-positiven Zellen in den Frakturkalli der Tac1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen festgestellt werden. Allerdings wurde in drei der vier Frakturkalli von Tac1^{-/-} Mäusen eine im Mittel zu 50% reduzierte

Zahl an Runx2-positiven Osteoblasten im Vergleich zu den WT-Kontrollen gezählt, nur in einem Tier wurde eine höhere Anzahl an Osteoblasten als in den WT-Kontrollen detektiert. Das Fehlen des sensiblen Neurotransmitters SP scheint die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten tendenziell zu beeinträchtigen. Abb. 26 B zeigt eine representative Färbung der Runx2-positiven Osteoblasten (Braun, schwarze Pfeile) im Frakturkallus einer WT-Kontrolle.

4.1.8.4 Anzahl an Osteoklasten im kalzifizierten Kallusgewebe

Durch Färbung der TRAP wurden Osteoklasten im kalzifizierten Kallusgewebe 13 Tage nach der Fraktur angefärbt, um den Einfluss des fehlenden SP und der fehlenden Signalübertragung des SNS auf die Osteoklastogenese zu analysieren. Abb. 27 A zeigt beispielhaft TRAP Färbungen von jeweils zwei unterschiedlichen Frakturkallus-Schnitten der SyX-, Tac1^{-/-} Mäuse und der WT-Kontrollen.

Im kalzifizierten Gewebe der Frakturkalli von WT-Kontrolltieren wurden 13 Tage nach Fraktur im Schnitt $46 (\pm 14)$ Osteoklasten/mm² gezählt (Abb. 27 B), repräsentative Bilder der Frakturkalli zeigen eine deutliche TRAP Färbung der Osteoklasten (Abb. 27 A, Kontrolle). In Frakturkalli der Tac1^{-/-} Mäuse hingegen konnte bei zwei der drei Proben keine TRAP Färbung im kalzifizierten Gewebe detektiert werden (Abb. 27 A, Tac1^{-/-}, oberes Bild). Es konnten jedoch $23 (\pm 10)$ TRAP gefärbte Osteoklasten/mm² im kalzifiziertem Gewebe bei drei der fünf Tac1^{-/-} Frakturkalli ermittelt werden (Abb. 27 A, Tac1^{-/-}, unteres Bild, B). Verglichen mit den WT-Kontrollen war die Anzahl an Osteoklasten/mm² in den Frakturkalli der Tac1^{-/-} Mäuse insgesamt signifikant geringer (Abb. 27 B). Frakturkalli von SyX-Mäusen zeigten eine signifikant höhere Anzahl an Osteoklasten (66 ± 17 Osteoklasten/mm²) im kalzifizierten Kallusgewebe im Vergleich zu Tac1^{-/-} Mäusen (Abb. 27 B). Die Beispielbilder (Abb. 27 A, SyX) verdeutlichen die intensive TRAP Färbung. Die Osteoklastogenese wird durch das Fehlen des sensiblen Neurotransmitters SP gehemmt, eine SyX scheint hingegen die Differenzierung der Osteoklasten zu fördern.

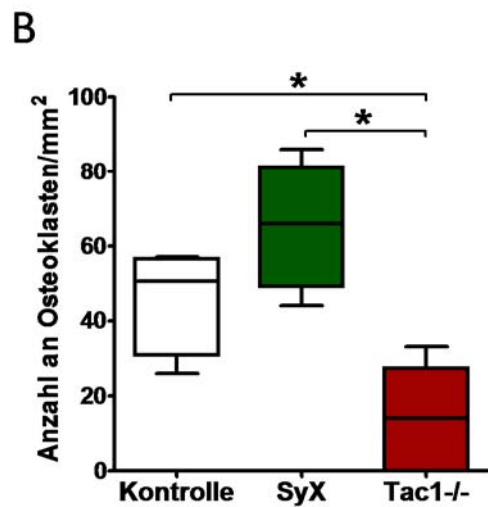
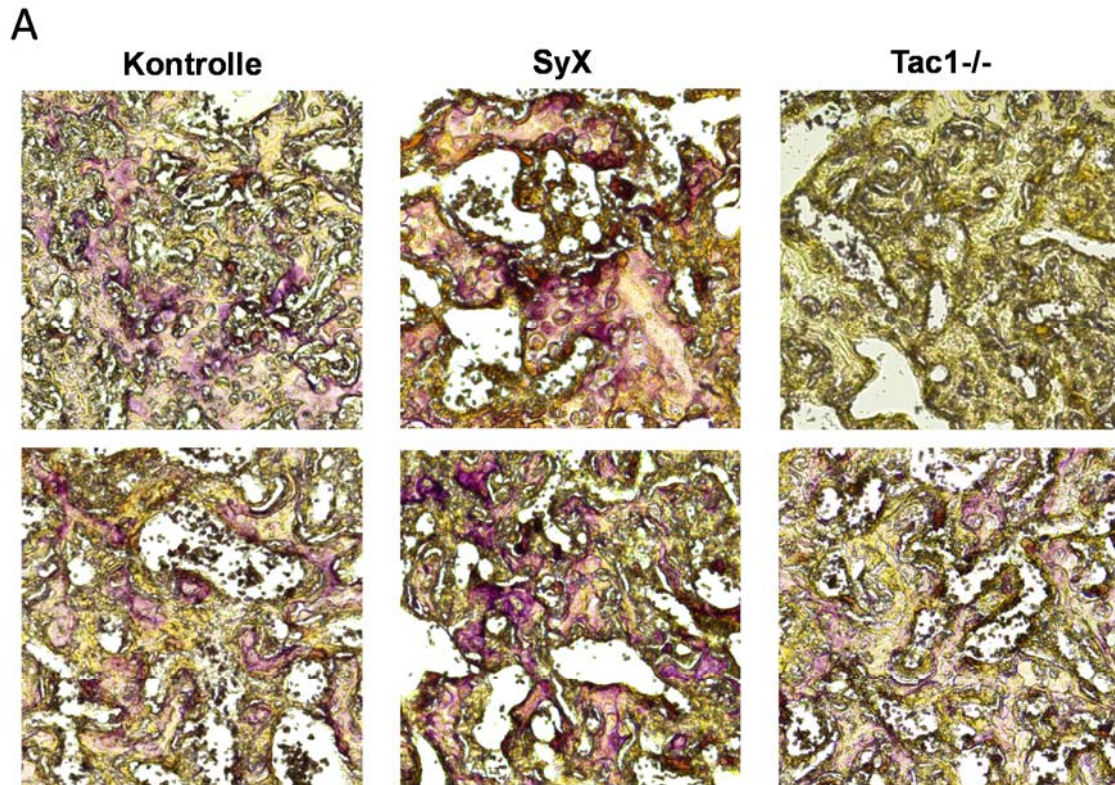


Abbildung 27: Vergleichende Analyse der Anzahl TRAP-positiv gefärbter Osteoklasten (Färbung in violett) in den Frakturkalli von SyX-, Tac1^{-/-} Mäusen und WT-Kontrollen. (A) Repräsentative Bilder der TRAP-Färbungen von jeweils 2 Frakturkalli der WT-Kontrollen, SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen. Vergrößerung: 10x, Mikroskop: Olympus B61. (B) Anzahl an TRAP-positiven Osteoklasten in den kalzifizierten Bereichen der Frakturkalli von SyX- (n=4), Tac1^{-/-} (n=5) Mäusen und WT-Kontrollen (n=4). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; * = p<0,05.

4.1.9 Biomechanische Analysen der frakturierten und nicht-frakturierten Femora

Die allgemeine mechanische Stabilität des Knochens wurde durch biomechanische Tests (Torsion, Torsionswinkel, Steifigkeit) untersucht, hierbei sollte festgestellt werden, ob der Verlust von SP bzw. die chemische Sympathektomie Auswirkungen auf die Knochenqualität und die Belastbarkeit des während der Heilung neu gebildeten Knochens haben. Die Analysen wurden 21 Tage nach Femurfraktur jeweils mit den frakturierten wie auch den nicht-frakturierten, kontralateralen Beinen durchgeführt. Die Tests wurden in Kooperation mit Dr. Richard Stange (Frakturen) und Dr. Britta Wieskötter (Biomechanik) vom Universitätsklinikum Münster durchgeführt.

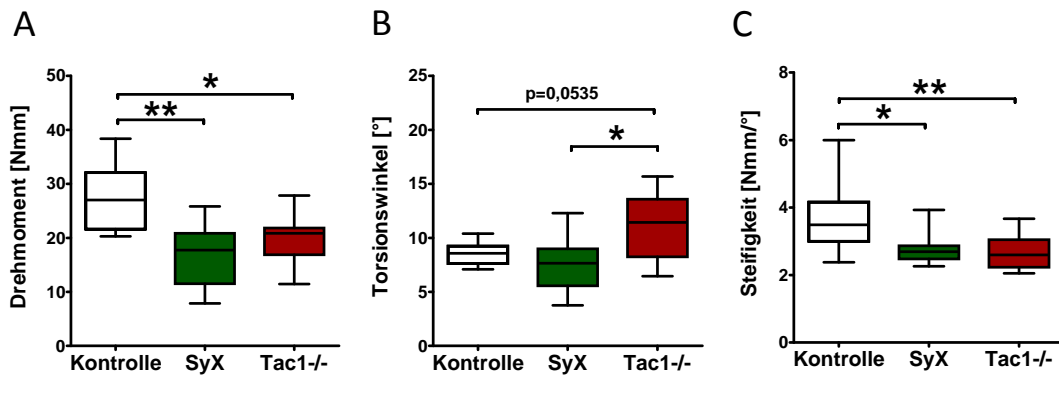
4.1.9.1 Biomechanische Eigenschaften der nicht-frakturierten Femora

Die Ergebnisse der biomechanischen Tests zeigten, dass nicht-frakturierte Femora von Tac1^{-/-}-Mäusen einer signifikant geringeren Torsionskraft (Drehmoment, Abb. 28 A) standhielten und der Knochen schon bei einem größeren Torsionswinkel (Abb. 28 B) versagte, wenn verglichen mit den WT-Kontrollen. Durch den Verlust des Neurotransmitters SP war die Steifigkeit in den nicht-frakturierten Femora der Tac1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen stark reduziert (Abb. 28 C).

Die Ergebnisse der Tests mit den nicht-frakturierten Femora der SyX-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen zeigen ein ähnliches Bild. Nach einer SyX war die Widerstandskraft gegen die Torsionskraft der Testmaschine in den nicht-frakturierten Femora im Vergleich zu den WT-Kontrollen deutlich verringert (Abb. 28 A), es konnte aber kein Unterschied hinsichtlich des Torsionswinkels gemessen werden (Abb. 28 B). Auch hier war die Steifigkeit der nicht-frakturierten Femora der SyX-Mäuse verglichen mit den WT-Kontrollen signifikant reduziert (Abb. 28 C).

Das ermittelte, maximale Drehmoment und die Steifigkeit unterschieden sich in nicht-frakturierten Femora der Tac1^{-/-}-Mäuse nicht von denen der SyX-Mäuse. Nicht-frakturierte Femora von Tac1^{-/-}-Mäusen versagten beim Test jedoch bei einem signifikant größeren Torsionswinkel im Vergleich zu den nicht-frakturierten Femora der SyX-Mäuse (Abb. 28 B).

Nicht-frakturierte Femora



Frakturierte Femora, 21 Tage nach Fraktur

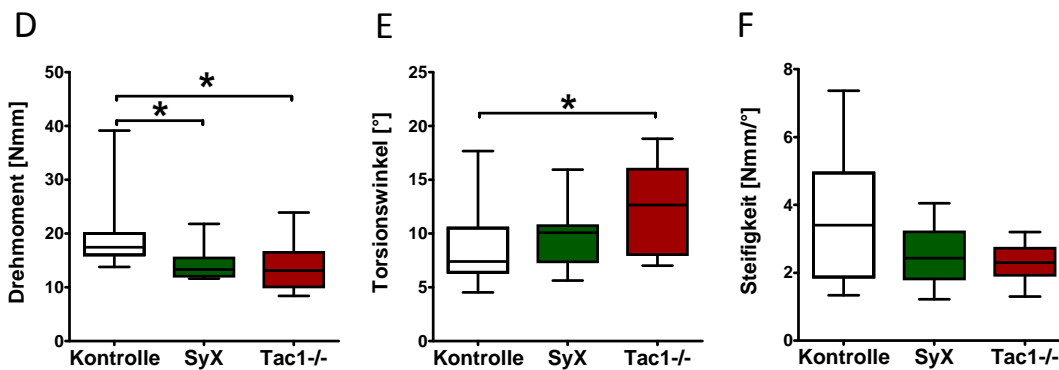


Abbildung 28: Biomechanische Analysen des Drehmoments (A, D), des Torsionswinkels (B, E) und der Steifigkeit (C, F) nicht-frakturierter, kontralateraler Femora (A-C) sowie frakturierter Femora (D-F) von SyX- (n=12), Tac1^{-/-} (n=10) Mäusen und WT-Kontrollen (n=13) 21 Tage nach Fraktur. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; * = p≤0,05; ** = p≤0,01.

4.1.9.2 Biomechanische Eigenschaften der frakturierten Femora 21 Tage nach Fraktur

21 Tage nach Fraktur wurde in den frakturierten Femora der Tac1^{-/-} Mäuse eine ähnlich verringerte mechanische Stabilität des Knochens ermittelt, wie im Falle der nicht-frakturierten Femora, wenn verglichen mit den jeweiligen WT-Kontrollen. Auch die frakturierten Femora versagten früher bei der Drehung um die Längsachse, was in einem signifikant verringerten Drehmoment und einem signifikant erhöhten Torsionswinkel resultierte (Abb. 28 D und E). Es konnte keine signifikant verringerte Steifigkeit in frakturierten Femora von Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen festgestellt werden (Abb. 28 F).

Auch die frakturierten Femora von SyX-Mäusen zeigen im Vergleich zu den WT-Kontrollen 21 Tage nach Fraktur eine signifikant reduzierte Widerstandskraft gegen die durch das Drehmoment

entstehenden Kräfte (Abb. 28 D), ähnlich wie in den kontralateralen, nicht-frakturierten Femora (Abb. 28 A). Der Torsionswinkel beim Versagen des frakturierten Knochens (Abb. 28 E) und die Steifigkeit (Abb. 28 F) unterschieden sich in SyX-Mäusen nicht von den WT-Kontrollen.

Bei einem Vergleich der mechanischen Eigenschaften frakturierter Femora von Tac1^{-/-} Mäusen mit denen der SyX-Mäuse konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Der Verlust des sensiblen Neurotransmitter SP und der Signalübertragung durch sympathische, katecholaminerge Nervenfasern verringern jeweils die mechanische Belastbarkeit der Knochenmatrix, sowohl im vorhandenen, nicht-frakturierten Femur, als auch im neu gebildeten Knochen des frakturierten Femur.

4.1.9.3 Vergleich der mechanischen Eigenschaften des neu gebildeten Knochens im Verlauf der Frakturheilung mit dem vorhandenen Knochen des nicht-frakturierten Beins

Um die mechanische Stabilität des während der Heilung neu gebildeten Knochens mit der des bereits bestehenden Knochens zu vergleichen, wurden die Testergebnisse des frakturierten Femurs eines Tieres ins Verhältnis zu den Werten des unfrakturierten, kontralateralen Femurs im jeweiligen Tier gesetzt.

Frakturierte Femora/nicht-frakturierte Femora

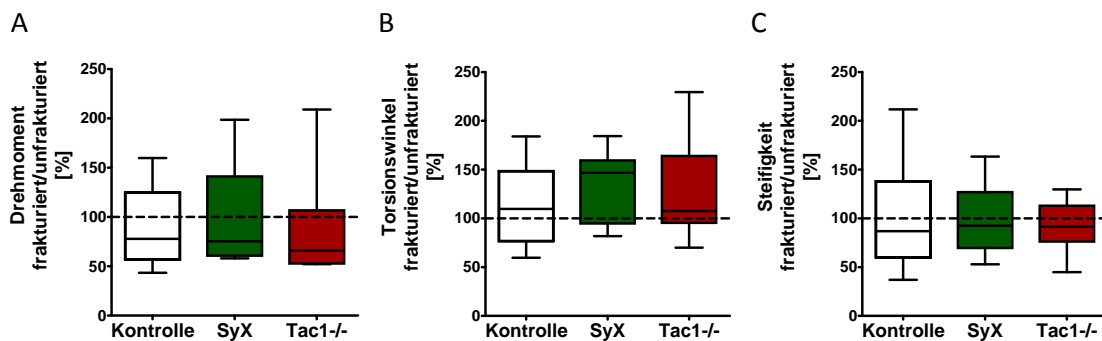


Abbildung 29: Biomechanische Analysen des Drehmoments (A), des Torsionswinkels (B) und der Steifigkeit (C) frakturierter Femora normiert auf die Ergebnisse der nicht-frakturierten, kontralateralen Femora (gestrichelte Linie bei 100%) von SyX- (n=12), Tac1^{-/-} (n=10) Mäusen, und WT-Kontrollen (n=13) 21 Tage nach Fraktur. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD.

Die Ergebnisse der unfrakturierten, kontralateralen Femora wurden hierfür auf 100 % gesetzt. In keinem der untersuchten Parameter (Drehmoment, Torsionswinkel, Steifigkeit) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem während der Frakturheilung neu gebildeten Knochengewebe in Bezug auf das im unfrakturierten, kontralateralen Femur vorhandene Knochengewebe festgestellt

werden. Der während der Heilung neu gebildete Knochen hatte innerhalb der Gruppen (SyX-, Tac1-/- Mäuse und WT-Kontrollen) die gleiche mechanische Stabilität wie der nicht-frakturierte Knochen im jeweiligen kontralateralen Femur (Abb. 29).

4.1.10 μ Ct – Analysen der frakturierten und nicht-frakturierten Femora

Die stabilisierten Femurfrakturen für die μ Ct Analysen wurden von Dr. Robert Springorum, Klinik und Poliklinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Regensburg, gesetzt. Die μ Ct-Analyse der frakturierten und nicht-frakturierten Femora wurde in Kooperation mit Dr. Volker Kuhn, Unfallchirurgische Klinik des Universitätsklinikums Innsbruck, durchgeführt. Die frakturierten und nicht-frakturierten Femora wurden 21 Tage nach Fraktur präpariert („harter, verknöchertes Kallus“), und in gefrorenem Zustand nach Innsbruck versandt, wo kurz vor den Analysen der zur Stabilisierung der Fraktur eingebrachte Metall-Pin entfernt wurde. Anhand der μ Ct-Analysen wurde die Trabekelanzahl (TRI-Tb.N.), die Trabekeldicke (TRI-Tb.Th.), der Abstand der Trabekel (TRI-Tb.Sp.), die Konnektivität (Conn.-dens.) und die Knochenmasse/Dichte (TRI-BV/TV) im Frakturkallus und an den proximal zur Fraktur gewählten VOIs (siehe Abschnitt [3.2.25](#)) der Femora ermittelt.

4.1.10.1 μ Ct – Analysen des verknöcherten Kallus 21 Tage nach Fraktur

In den frakturierten Femora wurden die Frakturkalli als „*volume of interests*“ (VOIs) gewählt. Ein Vergleich der Trabekelanzahl (Abb. 30 A), der Trabekeldicke (Abb. 30 B), des Trabekelabstands (Abb. 30 C), der Konnektivität (Abb. 30 D) und der Knochenmasse/Dichte (Abb. 30 E) in den verknöcherten Frakturkalli der SyX-Mäuse 21 Tage nach Fraktur mit den Werten der WT-Kontrollen ergab keine signifikanten Unterschiede.

In den verknöcherten Frakturkalli von Tac1-/- Mäusen 21 Tage nach Fraktur wurde eine tendenziell höhere Dichte (TRI-BV/TV) im Vergleich zu den Resultaten der WT-Kontrollen festgestellt (Abb. 30 E). Bezüglich der übrigen Parameter (Trabekelzahl, -dicke, -abstand, Konnektivität) konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

Die μ Ct-Analysen wurden an flexibel stabilisierten Femurfrakturen durchgeführt. Trotz der Stabilisierung variierte die Kallusgröße wider Erwarten erheblich. Dies führte zu hohen Standardabweichungen, die möglicherweise der Grund für die nur tendenziell sichtbaren Veränderungen sind.

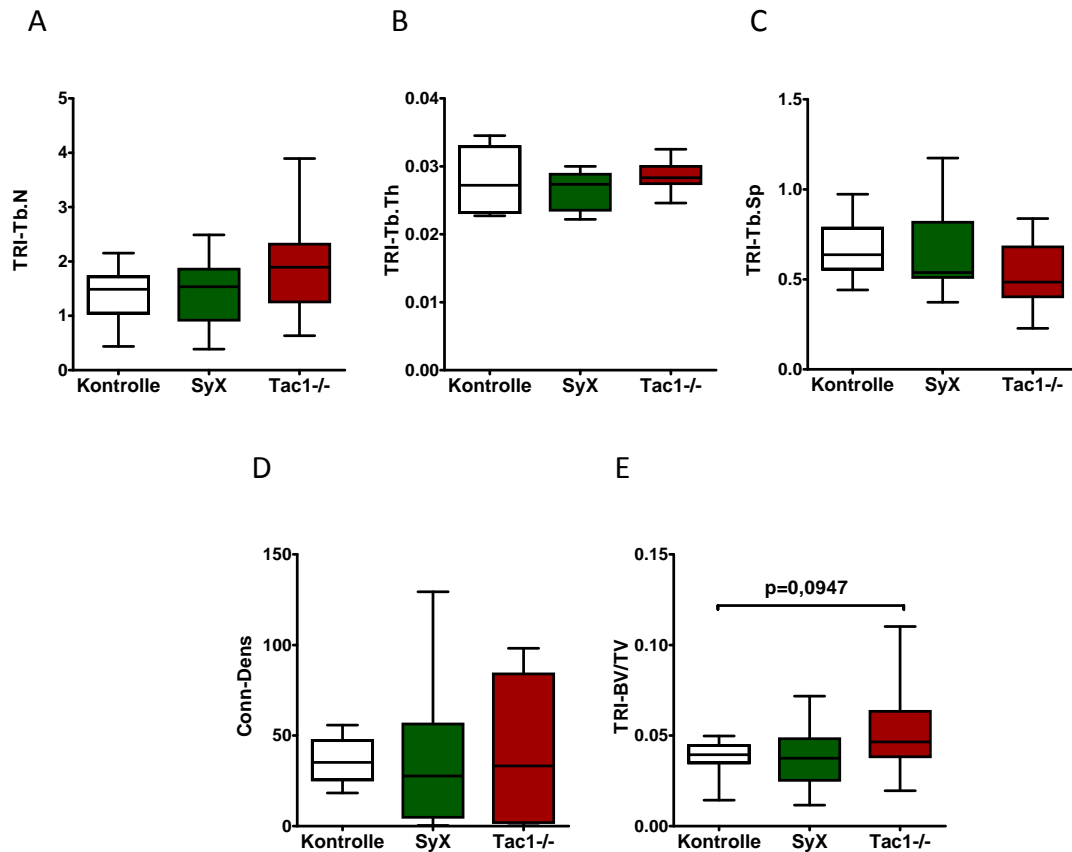


Abbildung 30: μ Ct Analysen des verknöcherten Kallus von SyX- (n=8), Tac1^{-/-} (n=9) Mäusen und WT-Kontrollen (n=11) 21 Tage nach Fraktur. Es wurde die Trabekelanzahl/TRI-Tb.N (A), die Trabekeldicke/TRI-Tb.Th (B), der Trabekelabstand/TRI-Tb.Sp (C), die Konnektivität/Conn-Dens (D) und die Knochenmasse/TRI-BV/TV (E) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD.

4.1.10.2 Strukturelle Knochenparameter im linken frakturierten Femur in einem VOI proximal zum Frakturkallus

Eine direkte Analyse der kortikalen Knochenstruktur in der Diaphyse war auf Grund der Frakturen in den linken Beinen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde ein "volume of interest" (VOI) im proximalen Bereich der Frakturstelle gewählt (siehe Abschnitt [3.2.25](#)).

Proximal zum Kallus hatten frakturierte Femora der SyX-Mäuse eine geringere Trabekelanzahl (Abb. 31 A), geringere Konnektivität (Abb. 31 D) und eine geringere Knochenmasse bzw. Dichte (Abb. 31 E) verglichen mit den WT-Kontrollen und den Tac1^{-/-} Mäusen. Der Abstand zwischen den Trabekeln war in frakturierten Femora von SyX-Mäusen proximal zum Kallus größer verglichen mit den frakturierten Femora der Tac1^{-/-} Mäuse (Abb. 31 C). Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des

Ergebnisse

Trabekelabstandes in den frakturierten Femora proximal zum Frakturkallus zwischen SyX-Mäusen und den WT-Kontrollen gemessen werden (Abb. 31 C).

Eine größere Anzahl an Trabekel (Abb. 31 A), sowie eine größere Konnektivität (Abb. 31 D) konnte proximal zum Kallus in frakturierten Femora von Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen und SyX-Mäusen gemessen werden. Der Abstand der Trabekel (Abb. 31 C) proximal zum Kallus in frakturierten Femora von Tac1^{-/-} Mäusen war geringer verglichen mit den WT-Kontrollen und den SyX-Mäusen. Die Knochendichte (Abb. 31 E) war in den frakturierten Femora der Tac1^{-/-} Mäuse proximal zum Kallus höher wenn verglichen mit den SyX-Mäusen.

In allen drei Mausgruppen konnte eine ähnliche Trabekeldicke im Bereich proximal zur Fraktur gemessen werden (Abb. 31 B).

VOI proximal zur Fraktur in frakturierten Femora

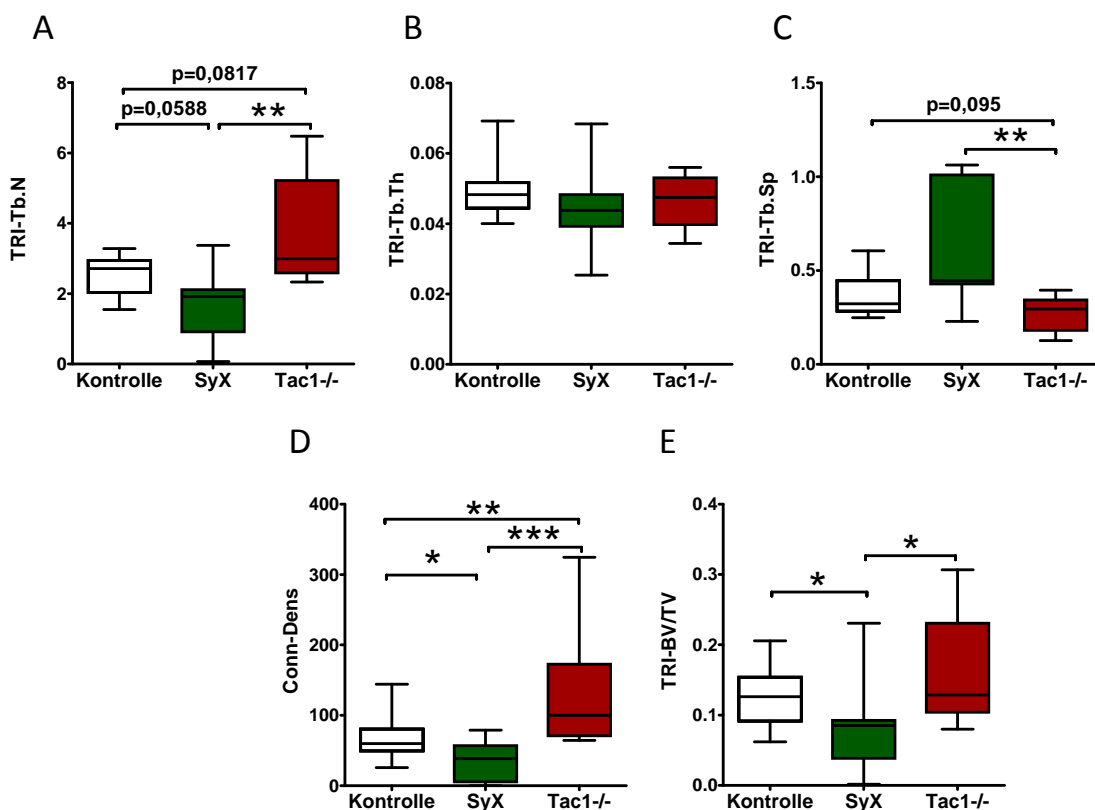


Abbildung 31: μ Ct Analysen der VOIs, die proximal zur Frakturstelle in den frakturierten Femora von SyX- (n=8), Tac1^{-/-} (n=9) Mäusen und WT-Kontrollen (n=12) 21 Tage nach Fraktur, gelegt wurden. Es wurde die Trabekelanzahl/TRI-Tb.N (A), die Trabekeldicke/TRI-Tb.Th (B), der Trabekelabstand/TRI-Tb.Sp (C), die Konnektivität/Conn-Dens (D) und die Knochenmasse/TRI-BV/TV (E) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

4.1.10.3 Strukturelle Knochenparameter im rechten kontralateralen, nicht-frakturierten Femur in einem proximalen VOI

Ein entsprechender VOI „proximal zur Fraktur“ wurde auch in den kontralateralen, nicht-frakturierten Beinen gemessen.

VOI proximal in nicht-frakturierten Femora

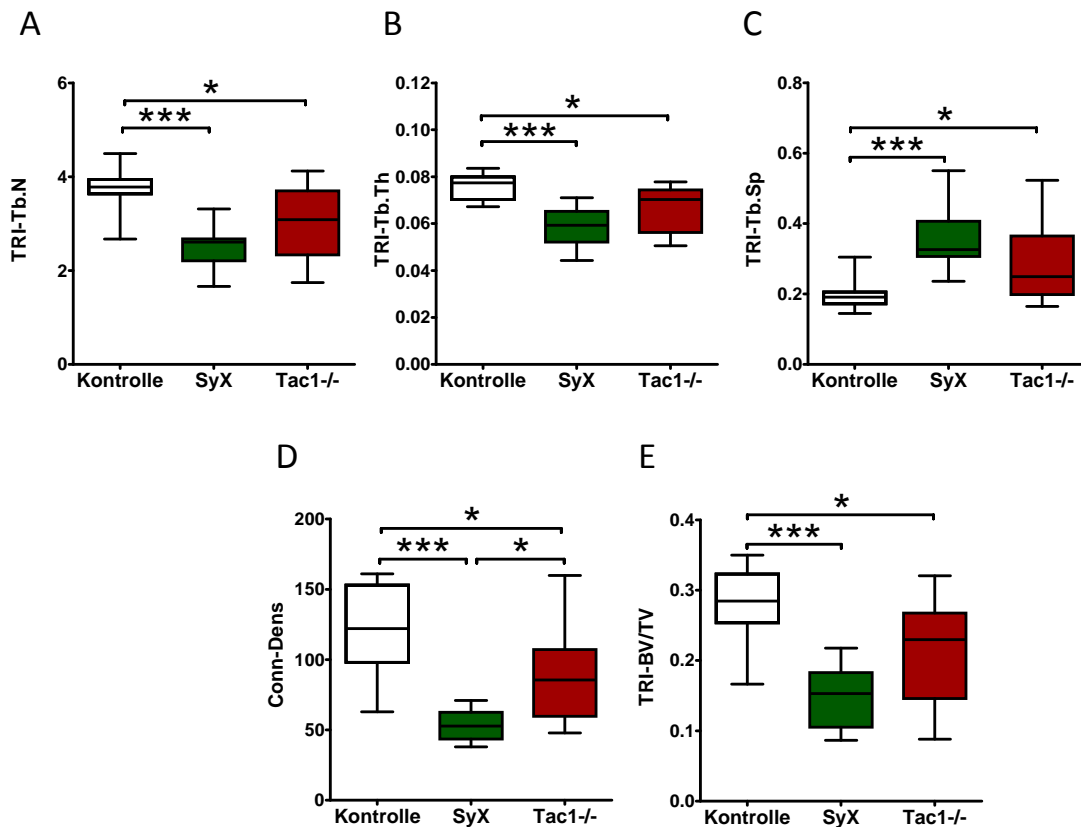


Abbildung 32: μ Ct Analysen der VOIs in den nicht-frakturierten Femora von SyX- (n=8), Tac1-/- (n=9) Mäusen und WT-Kontrollen (n=12) an einer vergleichbaren Stelle zum frakturierten Femur (proximal zur Fraktur) gelegen. Es wurde die Trabekelanzahl/TRI-Tb.N (A), die Trabekeldicke/TRI-Tb.Th (B), der Trabekelabstand/TRI-Tb.Sp (C), die Konnektivität/Conn-Dens (D) und die Knochenmasse/TRI-BV/TV (E) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

In Bezug auf die SyX-Mäuse bestätigten die Analysen die Resultate der frakturierten Femora, es wurden eine hoch signifikante Verringerung der Trabekelanzahl (Abb. 32 A), Trabekeldicke (Abb. 32 B), Konnektivität (Abb. 32 D) und Knochenmasse bzw. Dichte (Abb. 32 E) sowie eine hoch signifikante Erhöhung des Trabekelabstands (Abb. 32 C) im Vergleich zu den WT-Kontrollen gemessen.

Die kontralateralen Femora der Tac1-/- Mäuse zeigten ähnliche Resultate, auch hier war die Trabekelanzahl (Abb. 32 A), Trabekeldicke (Abb. 32 B), Konnektivität (Abb. 32 D) und Knochenmasse

bzw. Dichte (Abb. 32 E) signifikant verringert und der Abstand der Trabekel (Abb. 32 C) signifikant erhöht verglichen mit den WT-Kontrollen. Die Veränderungen waren jedoch nicht derart stark ausgeprägt wie im Falle der SyX-Mäuse. Des Weiteren war die Konnektivität im proximalen Bereich der nicht-frakturierten Femora der Tac1^{-/-} Mäuse signifikant größer verglichen mit den nicht-frakturierten Femora SyX-Mäuse (Abb. 32 D).

4.1.10.4 Vergleich der strukturellen Knochenparameter der proximalen VOIs frakturierter Femora mit den proximalen VOIs nicht-frakturierter Femora

Die Ergebnisse des proximal zum Frakturkallus untersuchten VOI im frakturierten Femur eines Tieres wurden mit den Ergebnissen des entsprechenden VOI in dem kontralateralen, nicht-frakturierten Femur des jeweiligen Tieres verglichen. Hiermit wurde untersucht, ob die Qualität der Knochenmatrix nahe der Fraktur durch die Abläufe während des Heilungsprozesses verändert wurde und ob das Fehlen von SP oder die chemische Sympathektomie einen zusätzlichen Einfluss darauf hat. Abb. 33 zeigt die prozentualen Unterschiede, wobei die Resultate der kontralateralen, nicht-frakturierten Beine jeweils als 100% (= gestrichelte Linie bei 100%) angesehen wurden.

In WT-Kontrollen konnten in den VOIs der frakturierten Femora verglichen mit den VOIs in den jeweiligen kontralateralen, nicht-frakturierten Femora eine signifikant geringere Trabekelanzahl (Abb. 33 A), geringere Trabekeldicke (Abb. 33 B), geringere Konnektivität (Abb. 33 D) und geringere Knochenmasse bzw. Dichte (Abb. 33 E) sowie ein erhöhter Abstand zwischen den Trabekeln (Abb. 33 C) gemessen werden. In Tac1^{-/-} Mäusen war die Trabekeldicke (Abb. 33 B) in den VOIs frakturierter Femora verglichen mit den VOIs der kontralateralen, nicht-frakturierten Femora verringert. Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der übrigen untersuchten Parameter gemessen werden. In SyX-Mäusen zeigte sich kein strukturell messbarer Unterschied zwischen den proximal gelegenen VOIs der frakturierten Femora und der entsprechenden VOIs in den kontralateralen, nicht-frakturierten Femora.

Die Mikroarchitektur des Knochens in den frakturierten Femora der WT-Kontrollen ist proximal zur Fraktur gelegen beeinträchtigt, verglichen mit der Mikroarchitektur der gleichen Bereiche in den kontralateralen, nicht frakturierten Femora. Diese Qualitätsverringering der Knochen-Mikroarchitektur konnte nicht für SyX- und Tac1^{-/-} Mäuse festgestellt werden. Die Mikroarchitektur des Knochens scheint sich in der Umgebung der Fraktur während des Heilungsprozesses bis 21 Tage nach Fraktur zu verändern. Die Qualität der Knochenmatrix wurde durch die fehlenden SP-vermittelten Effekte und durch die chemische Sympathektomie bereits verschlechtert, eine weitere Veränderung der Knochenmatrix bedingt durch den Heilungsprozess scheint nicht statt zu finden.

Frakturierte Femora/nicht-frakturierte Femora

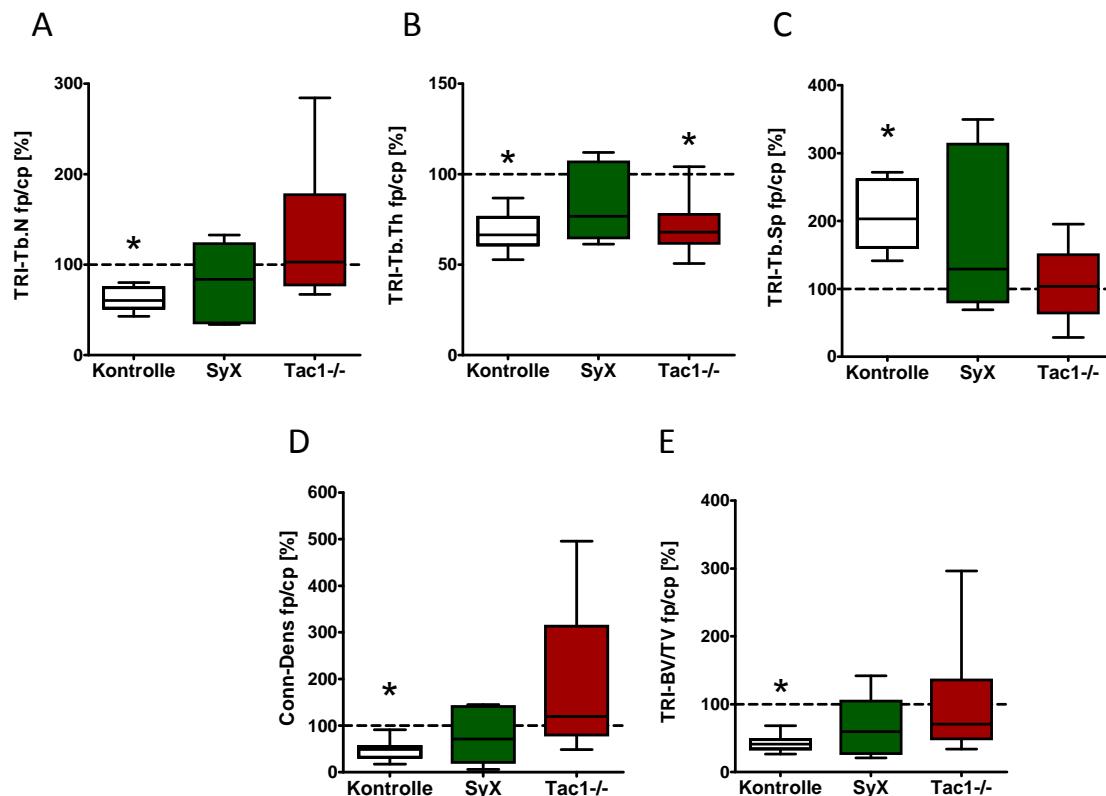


Abbildung 33: Vergleichende Analyse der VOIs proximal zu den Frakturkalli in den frakturierten Femora mit den entsprechenden VOIs in den kontralateralen, nicht-frakturierten Femora innerhalb der Gruppen der SyX- (n=8), Tac1-/- (n=9) Mäuse und WT-Kontrollen (n=12). Die Werte der kontralateralen, nicht-frakturierten Femora wurden auf 100% gesetzt und werden durch die gestrichelte Linie dargestellt. Es wurden die Trabekelanzahl/TRI-Tb.N (A), die Trabekeldicke/TRI-Tb.Th (B), der Trabekelabstand/TRI-Tb.Sp (C), die Konnektivität/Conn-Dens (D) und die Knochenmasse/TRI-BV/TV (E) jeweils innerhalb der SyX-, Tac1-/- Mäuse und WT-Kontrollen verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; * = p≤0,05.

4.2 In vitro Analysen

3.2.1 Vergleich primärer Osteoblasten und Osteoklasten aus SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen

Anhand der μ Ct-Analysen zeigte sich, dass die Röhrenknochen von SyX- und Tac1-/- Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen eine geringere biomechanische Stabilität und eine beeinträchtigte Mikroarchitektur der Knochenmatrix aufwiesen. Daraufhin wurden die zwei wichtigsten Zelltypen,

die Osteoblasten und Osteoklasten, die am Auf- und Abbau des Knochens beteiligt sind und daher die Stabilität und Mikroarchitektur direkt beeinflussen, unter Kulturbedingungen (*in vitro*) untersucht.

4.2.1.1 Primäre Osteoblasten aus SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen

Osteoblasten sind die Zellen, welche die Knochenmatrix während dem physiologischen Knochenumbau im adulten Organismus oder einem Reparaturprozess bilden und aufbauen. Die aus Knochenexplantaten von SyX-, Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen isolierten Osteoblasten wurden auf Veränderungen in der Apoptoserate, der Proliferationsrate und der ALP-Aktivität hin untersucht. Änderungen in den analysierten Parametern könnten zu einer schlechteren Knochenstabilität bzw. einer beeinträchtigten Mikroarchitektur führen und eine mögliche Erklärung für die Unterschiede im Knochenphänotyp der SyX- und Tac1-/- Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen liefern.

Die Caspase 3/7-Aktivität wurde gemessen, um Unterschiede in der Apoptoserate von Osteoblasten zu untersuchen, die Werte der WT-Kontrollen wurden auf 100% gesetzt. Die Apoptoserate der Osteoblasten aus SyX- und Tac1-/- Mäusen unterschied sich nach 7 und 21 Tagen Differenzierung in osteogenem Medium nicht signifikant von den WT-Kontrollen. Osteoblasten aus Tac1-/- Mäusen hatten nach 7 Tagen osteogener Differenzierung jedoch eine tendenziell höhere Apoptoserate, wenn verglichen mit Osteoblasten aus SyX-Mäusen. Nach 21 Tagen Kultivierung in osteogenem Medium unterschied sich die Apoptoserate in Osteoblasten aus Tac1-/- Mäusen deutlich zwischen den unabhängigen Experimenten und führte zu einer hohen Standardabweichung der Ergebnisse. Auf Grund der Versuchszahl (n=4) konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden, Osteoblasten aus Tac1-/- Mäusen scheinen jedoch häufiger in Apoptose zu gehen verglichen mit Osteoblasten aus WT-Kontrollen und SyX-Mäusen. (Abb. 34 A).

Die Proliferationsrate von Osteoblasten aus SyX-Mäusen unterschied sich nach 7 und 21 Tagen osteogener Kultivierung nicht von den WT-Kontrollen (100%) (Abb. 34 B). Ebenfalls konnte keine signifikante Änderung der Proliferationsrate in Osteoblasten aus Tac1-/- Mäusen nach 7 Tagen osteogener Kultivierung im Vergleich zu den WT-Kontrollen gemessen werden, was möglicherweise an der geringen Versuchszahl lag. Nach 21 Tagen in osteogenem Medium hatten Osteoblasten aus Tac1-/- Mäusen eine signifikant höhere Proliferationsrate, im Vergleich zu den Osteoblasten aus SyX-Mäusen (Abb. 34 B, *) und WT-Kontrollen (Abb. 34 B, #).

Ähnliche Ergebnisse zeigte die Messung der ALP-Aktivität, die als ein Maß für die Knochenbildungsaktivität der Osteoblasten diene. Osteoblasten aus SyX- und Tac1-/- Mäusen hatten nach 7 und 21 Tagen in osteogenem Medium eine ähnliche ALP-Aktivität, verglichen mit den WT-Kontrollen (100%) (Abb. 34 C). Die ALP-Aktivität von Osteoblasten aus Tac1-/- Mäusen war nach 7

Tagen osteogener Kultivierung signifikant geringer im Vergleich zu den Osteoblasten aus SyX-Mäusen. Nach 21 Tagen in osteogenem Medium wichen die Werte in den Osteoblasten aus Tac1^{-/-}-Mäusen deutlich voneinander ab, so dass sich auf Grund der nur wenigen unabhängigen Experimente keine signifikanten Veränderungen ergaben.

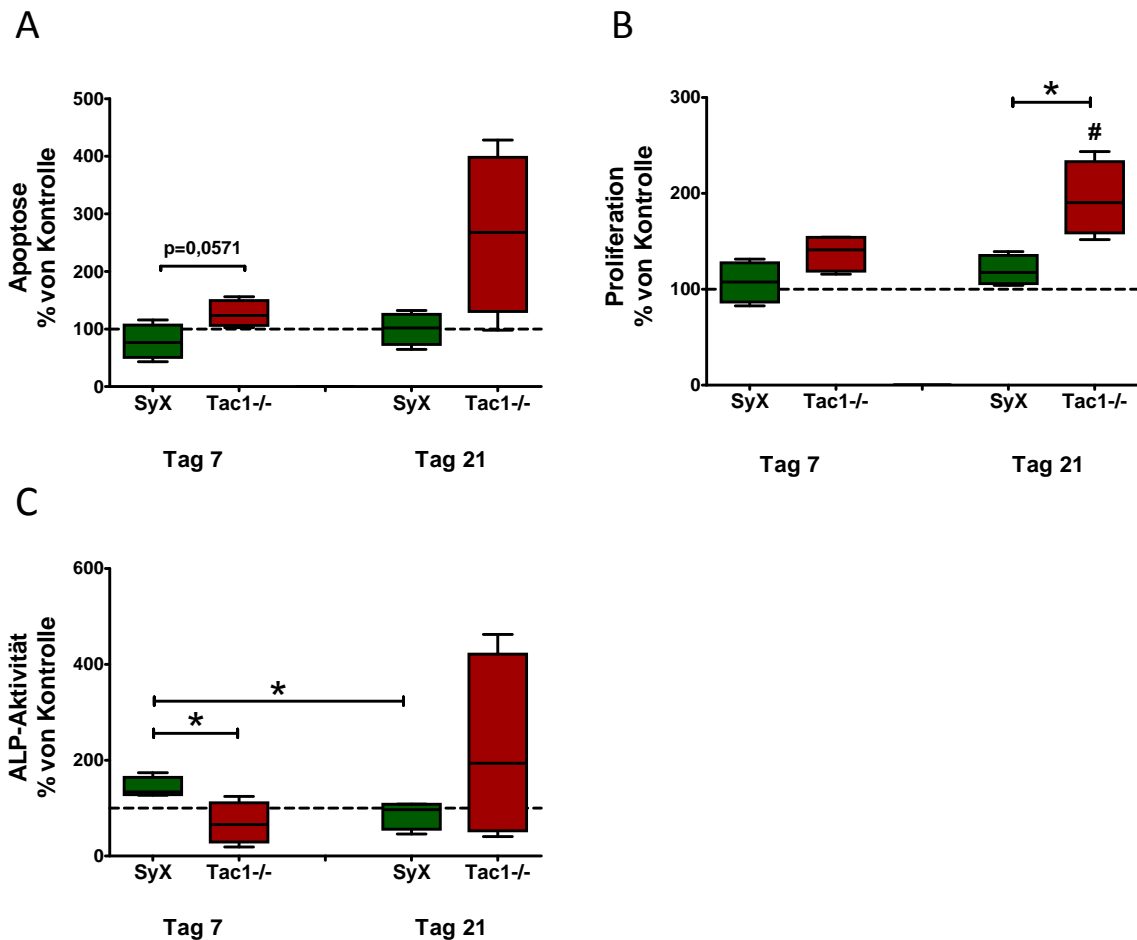


Abbildung 34: Analyse der Apoptoserate (A), der Proliferationsrate (B) und der ALP-Aktivität (C) primärer Osteoblasten aus Knochenexplantaten von SyX- (n=4), Tac1^{-/-} (n=4) Mäusen verglichen mit den WT-Kontrollen (n=4) nach 7 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die Werte der WT-Kontrollen wurden auf 100% gesetzt und werden durch die gestrichelte Linie dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD normiert auf die WT-Kontrollen (100%); * = $p \leq 0,05$; # = $p \leq 0,05$ signifikant zur WT-Kontrolle.

4.2.1.2 Primäre Osteoklasten aus SyX-, Tac1^{-/-}- Mäusen und WT-Kontrollen

Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow macrophages*/BMMs) isoliert aus den SyX-, Tac1^{-/-}- Mäusen und WT-Kontrollen wurden in Gegenwart von M-CSF und RANKL über eine Dauer von 5

Ergebnisse

Tagen zu Osteoklasten differenziert. Anschließend wurden Veränderungen in der Apoptoserate, der Anzahl und/oder der Aktivität der Osteoklasten untersucht. Ein übermäßiger Abbau der Knochenmatrix könnte verantwortlich für die reduzierte mechanische Stabilität und der Beeinträchtigung der Mikroarchitektur in den Knochen aus SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen sein.

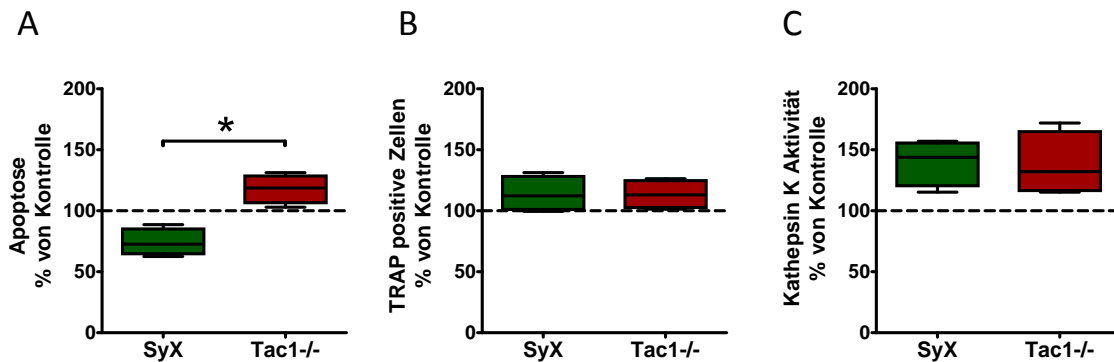


Abbildung 35: Analyse der Apoptoserate (A), der Anzahl TRAP-positiver Osteoklasten (B) und der Kathepsin K-Aktivität (C) primärer Osteoklasten nach 5 Tagen Differenzierung aus SyX- (n=4) und Tac1^{-/-} (n=4) Mäusen verglichen mit den WT-Kontrollen (n=4), die auf 100% genormt wurden und durch die gestrichelte Linie dargestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD normiert auf die WT-Kontrollen (100%); * = p≤0,05.

Die Apoptoserate in Osteoklasten aus Tac1^{-/-} Mäusen war nach 5 Tagen in Differenzierungsmedium signifikant höher verglichen mit Osteoklasten aus SyX-Mäusen. Im Vergleich zu den WT-Kontrollen konnte kein signifikanter, sondern nur ein tendenzieller Unterschied in der Apoptoserate von Osteoklasten aus SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen gemessen werden (Abb. 35 A). Die Apoptoserate scheint durch die Deletion des Neurotransmitters SP und durch die chemische Inhibierung des SNS beeinflusst zu werden. Auf Grund der geringen Versuchszahl ergab sich im Vergleich zu den WT-Kontrollen jedoch kein signifikanter Unterschied.

Durch Färbung der TRAP konnten nach 5 Tagen Differenzierung die Osteoklasten mit mehr als 3 Zellkernen gezählt und somit die Osteoklastogenese-Fähigkeit der BMMs untersucht werden. Wie aus Abb. 35 B hervorgeht, ist die Osteoklastogenese von BMMs aus SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen verglichen mit den WT-Kontrollen nicht signifikant verändert. BMMs aus Tac1^{-/-} Mäusen konnten ebenso zu Osteoklasten differenzieren, wie BMMs aus SyX-Mäusen. Die Osteoklastogenese scheint durch das Fehlen des sensiblen Neurotransmitters SP und die chemische Sympathektomie nicht beeinflusst zu werden.

Die Messung der Enzym-Aktivität von Kathepsin K gibt Aufschluss über die Resorptionsaktivität der Osteoklasten. Die Kathepsin K-Aktivität der Osteoklasten aus SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen schien 5 Tage

nach Differenzierung tendenziell höher zu sein, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Aktivität der Osteoklasten aus den WT-Kontrollen. Ebenso konnte kein Unterschied hinsichtlich der Kathepsin K-Aktivität der Osteoklasten aus Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Osteoklasten aus SyX-Mäusen gemessen werden (Abb. 35 C).

4.2.2 Analyse der Kallus-Explantatkulturen aus SyX-, Tac1^{-/-} Mäusen und WT-Kontrollen unter Zellkulturbedingungen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen des sensiblen Neurotransmitter SP und die Inhibierung des SNS durch eine chemische Sympathektomie die Entwicklung des Frakturkallus und die Gewebeverteilung in den ersten beiden Wochen nach der Fraktur beeinflussen. Für die Bildung des Frakturkallus sind hauptsächlich mesenchymale Zellen verantwortlich, die zu Chondrozyten differenzieren und den knorpeligen Softkallus bilden. Daher wurden die Kallus-Explantate aus Abschnitt 3.1.3 (Vermessung der Kallusgröße) verwendet um sie als Explantate für 7 Tage in chondrogenem Medium zu kultivieren. Um eine gute Diffusion des Kulturmediums zu gewährleisten, wurden die Kallus-Explantate vor der Kultivierung in kleine Stücke geteilt. Der Fokus lag nun auf der Analyse der Expression von Genen, die während der Entzündungsreaktion und während der Bildung des knorpeligen Gewebes eine Rolle spielen.

Um die Vorgänge während der Entzündungsreaktion simulieren zu können, wurden einige der Explantatkulturen jeder Mausgruppe für die letzten 24 Stunden mit IL-1 β (5ng/ml) stimuliert.

Durch die gezielte Deletion des sensiblen Neurotransmitters SP konnten die Effekte eines einzigen Mediators untersucht werden. Durch eine zusätzliche Stimulation mit SP in unterschiedlichen Konzentrationen wurde in weiteren Analysen untersucht, ob die Effekte, die durch das Fehlen von SP entstanden waren, reversibel sind. Hierfür wurden Kallus-Explantate von WT-Kontrollen und Tac1^{-/-} Mäusen für die letzten 24 Stunden mit SP in den Konzentrationen 10⁻⁸ und 10⁻¹⁰ M, mit und ohne (w/o) IL-1 β stimuliert.

4.2.2.1 Toxizitätstest der Überstände aus den Kallus-Explantatkulturen

Während der Dauer der Kultivierung könnten die Zellen in den Explantatkulturen absterben und somit eine weitere Zell-basierte Untersuchung der Explantate verhindern. Auch die Stimulation mit IL-1 β und dem Neurotransmitter SP könnte einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben. Daher wurden die Zellkulturüberstände zufällig ausgewählter Explantatkulturen von WT-Kontrollen aus jeweils vier unabhängigen Versuchen einem Toxizitätstest unterzogen, um die Vitalität der Zellen

Ergebnisse

nach 7 Tagen unter Zellkulturbedingungen zu analysieren. Hierfür wurde die Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) im Medium der Explantatkulturen gemessen und mit einer Assay-Positivkontrolle verglichen.

Ein Vergleich mit der Positivkontrolle (*High control*, 100%) zeigte, dass die Kultivierung der Explantate über 7 Tage unter Zellkulturbedingungen die Vitalität der Zellen in den Kallus-Explantaten nicht negativ beeinflusste (Abb. 36). Auch die Stimulationen der Frakturkalli mit IL-1 β und dem Neurotransmitter SP zeigten keine signifikanten Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen in den Frakturkalli.

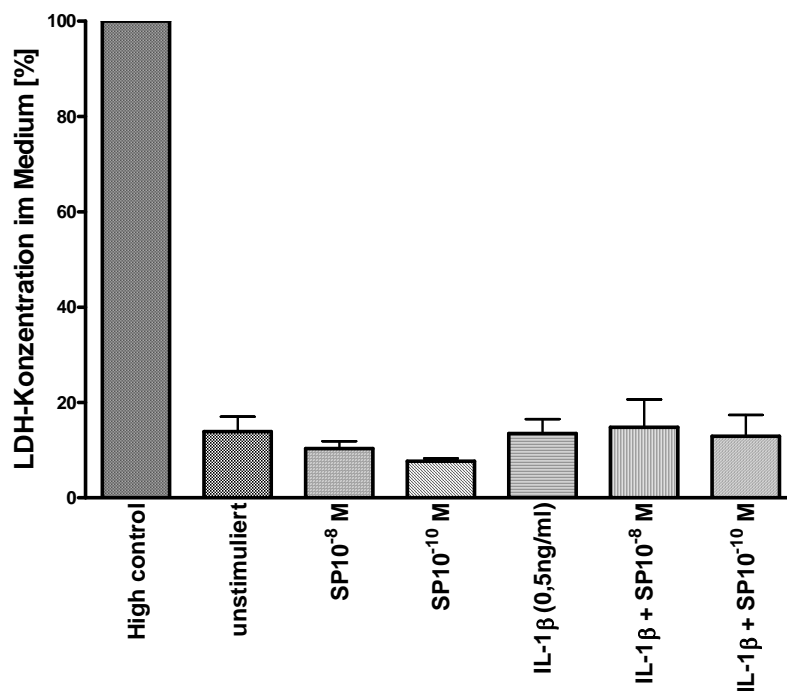


Abbildung 36: LDH-Konzentration in den Medien der Kallus-Explantate während der letzten 24 Stunden. Die Positivkontrolle (*High Control*) wurde auf 100% gesetzt und die Werte der Explantatkulturüberstände darauf bezogen. Die Kultivierung hatte keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen in den Kallus-Explantaten. Die Stimulation mit IL-1 β und/oder SP in den Konzentrationen 10⁻⁸ und 10⁻¹⁰ M zeigte keinen negativen Effekt auf die Vitalität der Zellen in den Explantaten (n=4). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD.

4.2.2.2 Unterschiede in der Genexpression zwischen WT-Kontrollen und SyX-Mäusen

Aus den vorangegangenen Experimenten zeigt sich, dass das SNS die Kallusreife im Verlauf der Frakturheilung beeinflusst. Daher wurde die Expression einiger Gene untersucht, die am Auf- und Abbau der Matrix beteiligt sind sowie Gene, die im Verlauf der Entzündungsreaktion eine wichtige

Rolle spielen und die Differenzierung der Zellen und somit auch den Reifeprozess des Frakturkallus beeinflussen könnten. Zu den Genen zählen *mmp-2*, *-3* und *-14*, deren Inhibitoren, *timp-1*, *-2* und *-3*, sowie die Entzündungsmediatoren *IL-6*, *MIP-2*, *cox-2* und *iNos*.

Wie aus der Abb. 37 A hervorgeht, war die Expression aller untersuchten Gene in den Kallus-Explantaten der SyX-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen signifikant erhöht. Durch die chemische Sympathektomie wurde die Expression von *mmp-2*, *-3* und *-14*, die am Abbau der Matrix beteiligt sind, und deren Inhibitoren, *timp-1*, *-2* und *-3* erhöht. Für das Gen *mmp-3* konnte eine sehr starke Zunahme der Expression detektiert werden (MMP-3 ist besonders am Umbau der Knorpelmatrix beteiligt). Auch die Expression der Entzündungsmediatoren *IL-6*, *MIP-2*, *cox-2* und *iNos* war signifikant höher im Vergleich zu den WT-Kontrollen.

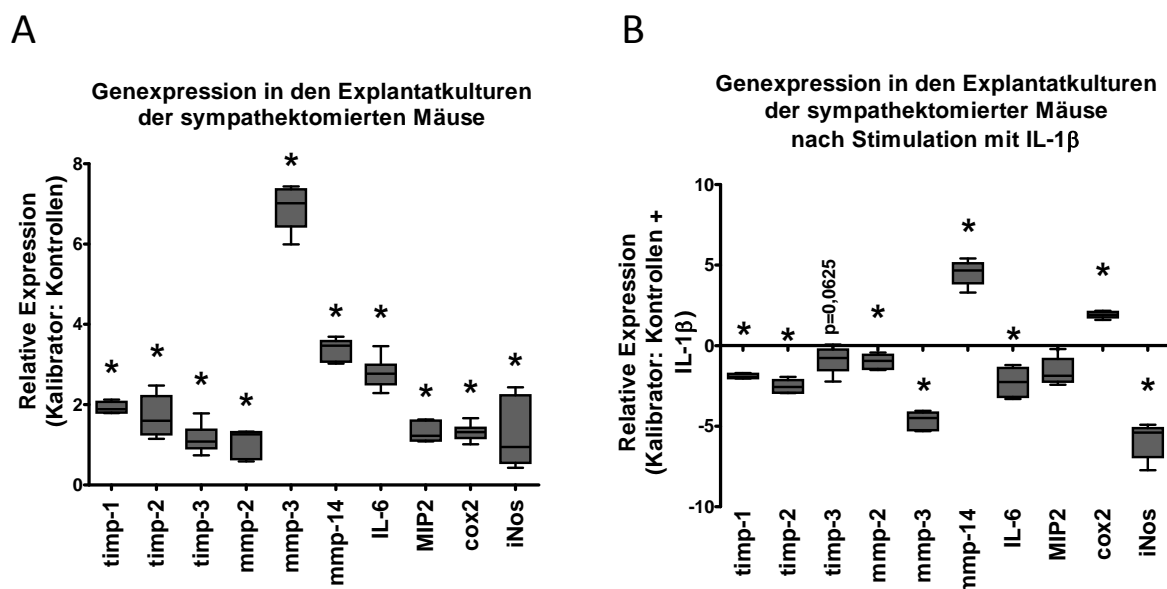


Abbildung 37: Genexpression in den Kallus-Explantaten von SyX-Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen ohne (A) (n=6) und mit zusätzlicher Stimulation durch IL-1 β (0,5ng/ml) (B) (n=5). Dargestellt wird die relative Änderung (Logarithmus zur Basis 2) der Genexpression in Kallus-Explantaten aus SyX-Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Die WT-Kontrollen dienten als Kalibrator und wurden auf 0 normiert, sie werden durch die 0-Linie (x-Achse) des Graphen dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; * = p \leq 0,05.

Durch die Stimulation mit IL-1 β (0,5 ng/ml) wurde eine Entzündungsreaktion simuliert, Abb. 37 B zeigt die Expression der untersuchten Gene in entzündlichem Milieu in Kallus-Explantaten von SyX-Mäusen im Vergleich zur WT-Kontrolle. Die Expression der Gene *timp-1* und *-2* ist signifikant, die Expression des von *timp-3* tendenziell verringert in Explantaten der SyX-Mäuse verglichen mit den WT-Kontrollen. Ebenso ist die Genexpression von *mmp-2* und *-3* signifikant reduziert in den Kallus-

Ergebnisse

Explantaten der SyX-Mäuse verglichen mit den WT-Kontrollen, die Expression von *mmp-14* hingegen ist signifikant höher als in den Kallus-Explantaten der WT-Kontrollen. Für die Entzündungsmediatoren *IL-6* und *iNos* konnte in den Explantaten der SyX-Mäuse eine signifikant reduzierte Genexpression im Vergleich zu den WT-Kontrollen detektiert werden, signifikant erhöht ist dagegen die Expression von *cox-2* in den Kallus-Explantaten nach Sympathektomie im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Keine Veränderung des Expressionsmusters in entzündlichem Milieu konnte für das Gen *MIP-2* festgestellt werden.

4.2.2.3 Unterschiede in der Genexpression zwischen WT-Kontrollen und Tac1^{-/-} Mäusen

Das sensible Nervensystem ist über seinen Neurotransmitter SP und der Signalübertragung über den NK1R in der Lage die Kallusreifung während der Frakturheilung zu beeinflussen. In den Kallus-Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse wurden daher die gleichen Gene untersucht und mit den WT-Kontrollen verglichen. Die Abb. 38 zeigt die relative Änderung der Expression (Logarithmus zur Basis 2) von *timp-1*, *-2*, *-3*, *mmp-2*, *-3*, *-14*, *IL-6*, *MIP-2*, *cox-2* und *iNos* in Kallus-Explantaten aus Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich mit den WT-Kontrollen (Kalibrator) ohne (A) und mit zusätzlicher Stimulation durch IL-1 β (B).

Die Expression der Gene *timp-1*, *-2* und *-3* war in Kallus-Explantaten von Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 38 A). Auch die Expression von *mmp-3* und *-14* war signifikant höher in den Kallus-Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse wenn verglichen mit den WT-Kontrollen. Für die Entzündungsmediatoren *cox-2* und *MIP-2* wurde eine tendenziell erhöhte Expression festgestellt, die Expression der *iNos* dagegen war signifikant reduziert in den Kallus-Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Die Expression der Gene *mmp-2* und *IL-6* war in den Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen nicht verändert.

In entzündlichem Milieu zeigte sich ein entgegengesetztes Bild (Abb. 38 B), die Expression der Gene *timp-1*, *-2*, *-3*, *mmp-2*, *-3*, *IL-6* und *iNos* war nach Stimulation mit IL-1 β in den Kallus-Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse signifikant reduziert, die Expression von *cox-2* dagegen signifikant erhöht verglichen mit den WT-Kontrollen. Die Expression von *mmp-14* und *MIP-2* war in den Kallus-Explantaten von Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen nicht verändert.

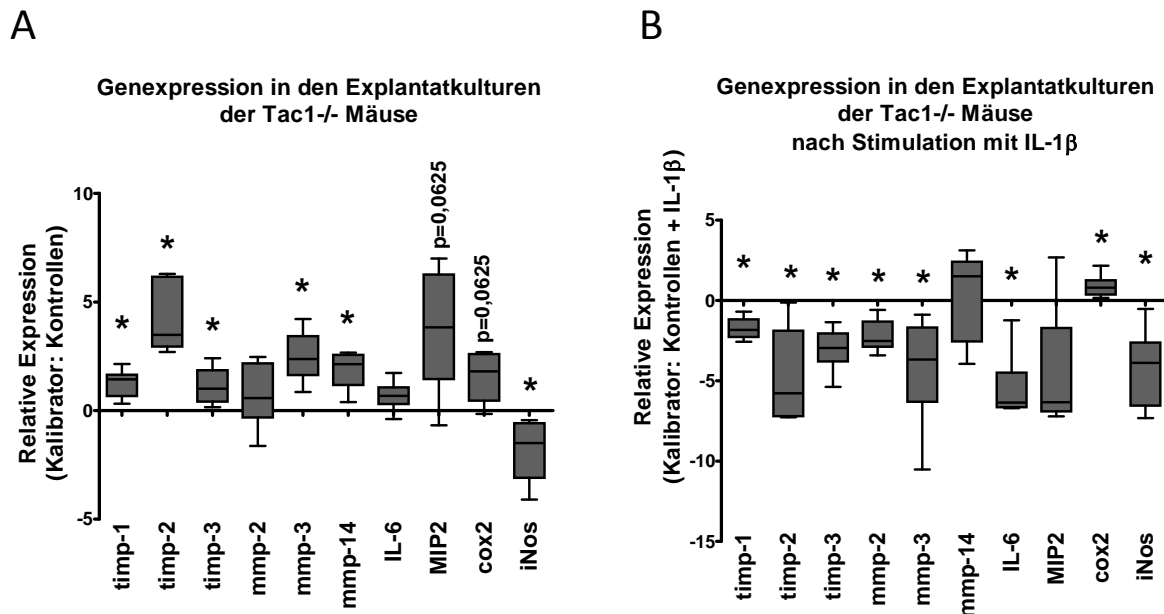


Abbildung 38: Genexpression in den Kallus-Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen ohne (A) (n=6) und mit zusätzlicher Stimulation durch IL-1β (0,5ng/ml) (B) (n=6). Dargestellt wird die relative Änderung (Logarithmus zur Basis 2) der Genexpression in Kallus-Explantaten aus Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Die WT-Kontrollen dienten als Kalibrator und wurden auf 0 normiert, sie werden durch die 0-Linie (x-Achse) des Graphen dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; * = p≤0,05.

4.2.2.4 Genexpression in den Kallus-Explantatkulturen von WT-Kontrollen und Tac1^{-/-} Mäusen nach zusätzlicher Stimulation mit SP

Die Expression selektiver Gene, die während des Matrix-Umbaus und der Entzündungsreaktion eine Rolle spielen, ist in den Kallus-Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen tendenziell (*MIP-2*) oder signifikant erhöht (*timp-2*, *-3*, *mmp-3*, *-14*, *cox-2*) bzw. reduziert (*iNos*). In entzündlichem Milieu dagegen (Stimulation mit IL-1β) ist die Expression dieser Gene in den Kallus-Explantaten meist tendenziell (*timp-1*, *MIP-2*) oder signifikant reduziert (*timp-2*, *mmp-2*, *-3*) oder unterscheidet sich nicht von den WT-Kontrollen. Um zu testen, ob diese Effekte durch eine zusätzliche Stimulation mit SP reversibel sind, wurden die Kallus-Explantate von Tac1^{-/-} Mäusen die letzten 24 h des Kultivierungszeitraums mit SP in den Konzentrationen 10⁻⁸ und 10⁻¹⁰ M und w/o IL-1β (0,5 ng/ml) stimuliert. Zudem wurden Kallus-Explantate der WT-Kontrollen mit SP (10⁻⁸ und 10⁻¹⁰ M), w/o IL-1β, stimuliert. Als Kalibratoren wurden jeweils Kallus-Explantate der WT-Kontrollen w/o IL-1β verwendet (dargestellt durch die 0-Linie der Graphen).

4.2.2.4.1 Genexpression von *timp-1*, -2 und -3 nach Stimulation mit SP und w/o IL-1 β

Die Abb. 38 zeigt die Genexpression der TIMPs in Kallus-Explantaten von WT-Kontrollen und Tac1 $^{-/-}$ -Mäusen nach Stimulation mit SP (A-C) bzw. mit SP plus IL-1 β (D-F).

Die Genexpression von *timp-1* wurde in Kallus-Explantaten von WT-Kontrollen durch Stimulation mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP nicht signifikant reguliert (Abb. 39 A), dies gilt ebenso für die Gene *timp-2* (Abb. 39 B) und *timp-3* (Abb. 39 C). In unstimulierten Kallus-Explantaten von Tac1 $^{-/-}$ -Mäusen waren *timp-1*, *timp-2* und *timp-3* im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen signifikant höher exprimiert. Dieser Effekt konnte durch eine Stimulation mit 10^{-8} M SP nicht, durch Stimulation mit 10^{-10} M SP für *timp-1* jedoch teilweise rückgängig gemacht werden (Abb. 39A). Ein ähnliches Ergebnis konnte für die Genexpression von *timp-3* (Abb. 39 C) beobachtet werden, die Überexpression in den Kallus-Explantaten der Tac1 $^{-/-}$ -Mäuse konnte durch Stimulation mit 10^{-8} M SP teilweise auf das Level der Genexpression in den WT-Kontrollen verringert werden. Für *timp-2* (Abb. 39 B) konnte keine Reduktion der Genexpression durch Stimulation mit SP (beide Konzentrationen) erreicht werden.

Im entzündlichen Milieu (alle Bedingungen in Gegenwart von 0,5 ng/ml IL-1 β) erhöhte die Stimulation mit 10^{-8} M SP in den Explantaten der WT-Kontrollen die Expression der Gene *timp-1* und *timp-3* signifikant (Abb. 39 D, F) und die Expression des Gens *timp-2* tendenziell im Vergleich mit der unstimulierten WT-Kontrolle (Abb. 39 E). Der Zusatz von 10^{-10} M SP zeigte keine Wirkung auf die Genexpression von *timp-1*, -2 und -3 in den Kallus-Explantaten der WT-Kontrollen. Die Expression der Gene *timp-1*, -2 und -3 war in den unstimulierten Explantaten der Tac1 $^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen signifikant reduziert. Eine Stimulation mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP konnte diese Effekte für die Gene *timp-1* und -2 teilweise (Abb. 39 D, E) und für das Gen *timp-3* nach Stimulation mit 10^{-10} M SP signifikant (Abb. 39 F) rückgängig machen und wieder auf das Level der Genexpression in den unstimulierten WT-Kontrollen erhöhen. Fazit: Die durch die Deletion des Tachykinin-1 Gens verursachten Effekte auf die Genexpression von *timp-1*, -2 und -3 sind durch Stimulation mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP sowohl in Abwesenheit, als auch in Gegenwart von IL-1 β teilweise reversibel.

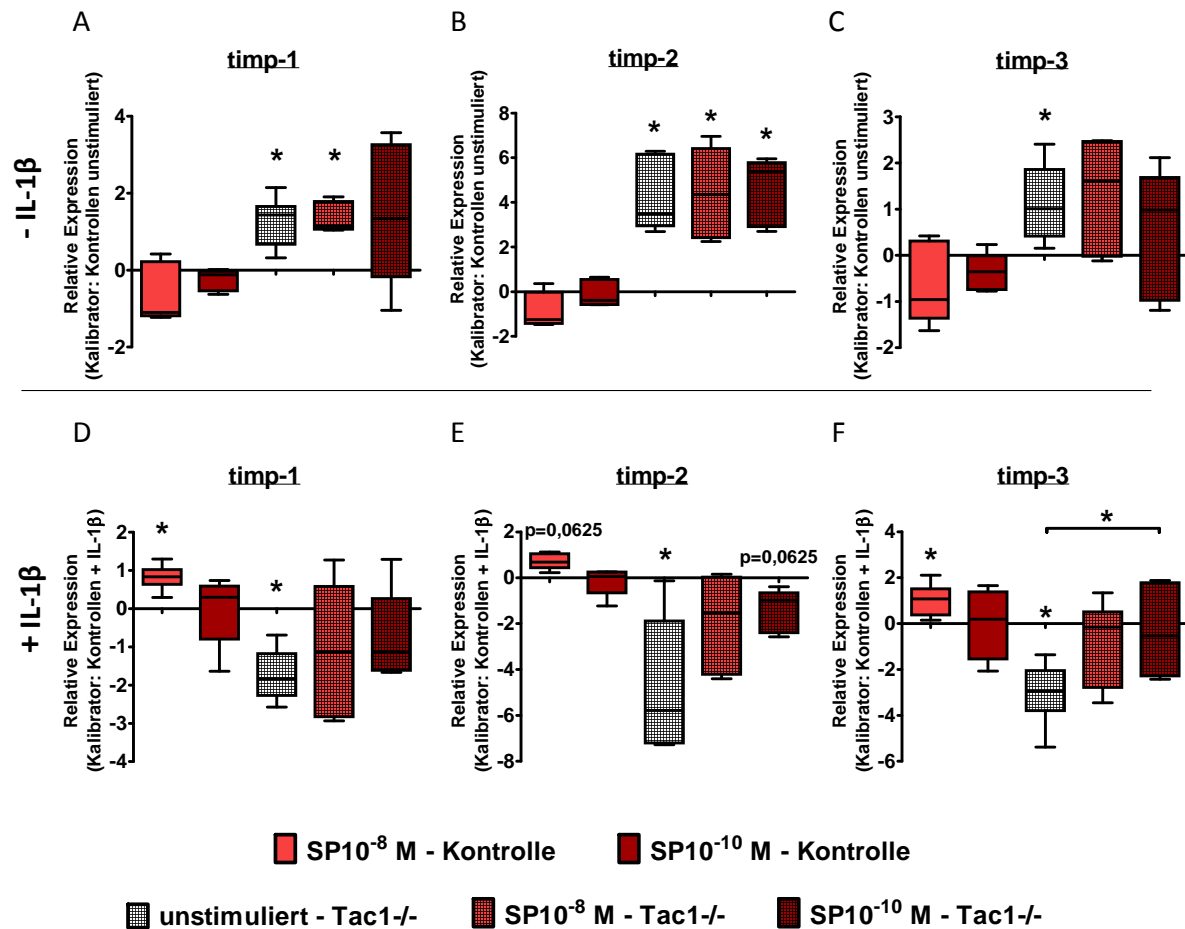


Abbildung 39: Relative Änderung der Genexpression (Logarithmus zur Basis 2) von *timp-1* (A, D), *timp-2* (B, E) und *timp-3* (C, F) in Kallus-Explantaten von WT-Kontrollen und Tac1^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit SP in den Konzentrationen 10⁻⁸ M und 10⁻¹⁰ M, in Abwesenheit (A-C) und in Gegenwart von IL-1β (0,5 ng/ml) (D-F). Unstimulierte WT-Kontrollen (A-C) bzw. die WT-Kontrollen in Gegenwart von IL-1β (D-F) dienen als Kalibrator, sie wurden auf "0" normiert und werden durch die 0-Linie der Graphen (x-Achse) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; * = p ≤ 0,05; * ohne Linie = signifikant zur unstimulierten WT-Kontrolle w/o IL-1β (= 0-Linie); * mit Signifikanzlinie = signifikant zwischen den durch die Linie gekennzeichneten Boxplots; n = 5-6.

4.2.2.4.2 Genexpression von *mmp-2*, -3 und -14 nach Stimulation mit SP und w/o IL-1β

Ebenso wurde die Expression von MMP-2, -3 und -14 untersucht. Die Expression des Gens *mmp-2* wurde von keiner Bedingung beeinflusst (Abb. 40 A). Die Expression der Gene *mmp-3* und -14 wurde in Kallus-Explantaten der WT-Kontrollen durch Stimulation mit 10⁻⁸ M/ 10⁻¹⁰ M SP nicht signifikant verändert (Abb. 40 B, C). In den unstimulierten Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse war die Expression der Gene *mmp-3* und -14 im Vergleich zur unstimulierten WT-Kontrolle signifikant erhöht. Dieser Effekt konnte durch Stimulation mit 10⁻¹⁰ M SP tendenziell rückgängig gemacht werden, die Stimulation mit 10⁻⁸ M SP veränderte die Expression der Gene im Vergleich zur unstimulierten WT-Kontrolle nicht (Abb. 40 B, C).

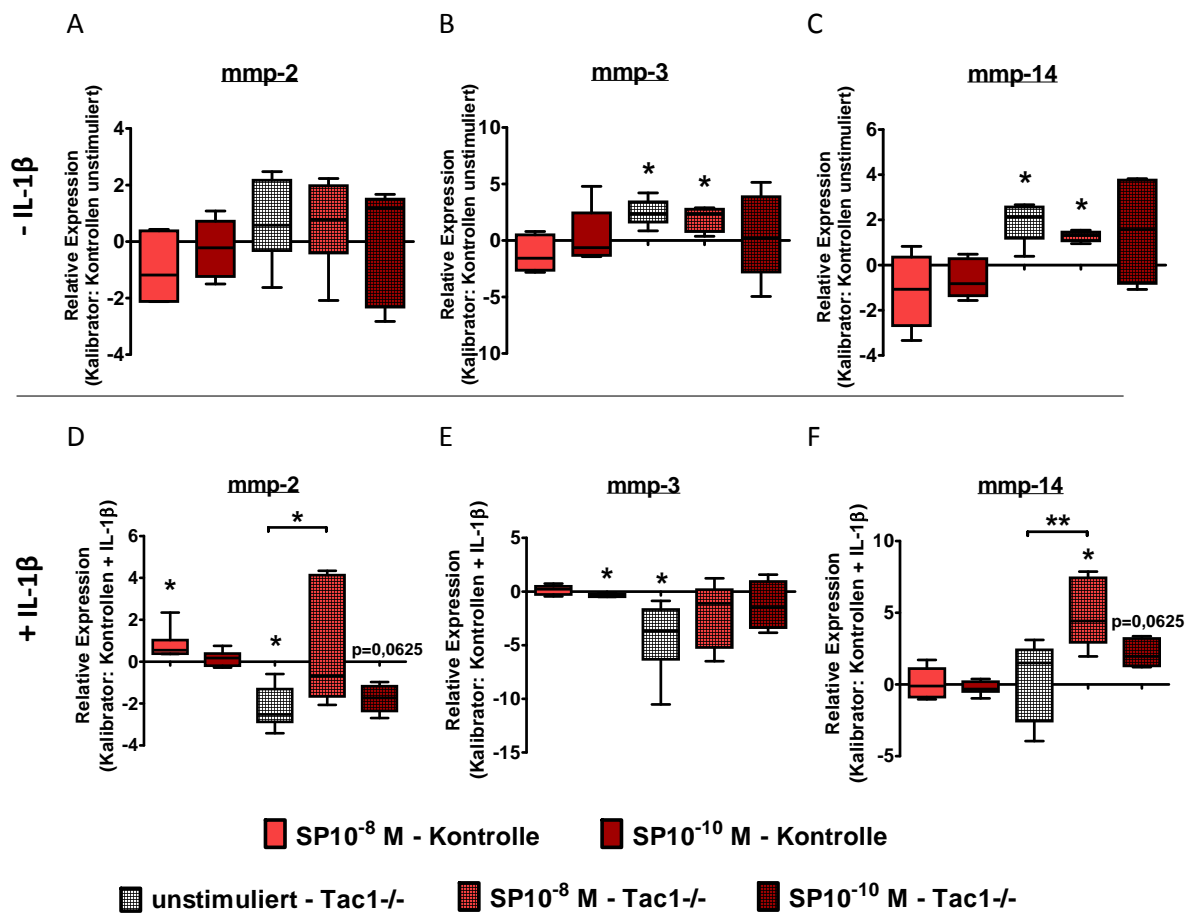


Abbildung 40: Relative Änderung der Genexpression (Logarithmus zur Basis 2) von *mmp-2* (A, D), *mmp-3* (B, E) und *mmp-14* (C, F) in Kallus-Explantaten von WT-Kontrollen und Tac1^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit SP in den Konzentrationen 10⁻⁸ M und 10⁻¹⁰ M, in Abwesenheit (A-C) und in Gegenwart von IL-1 β (0,5ng/ml) (D-F). Unstimulierte WT-Kontrollen (A-C) bzw. die WT-Kontrollen in Gegenwart von IL-1 β (D-F) dienen als Kalibrator, sie wurden auf "0" normiert und werden durch die 0-Linie der Graphen (x-Achse) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; * ohne Linie = signifikant zur unstimulierten WT-Kontrolle w/o IL-1 β (= 0-Linie); * mit Signifikanzlinie = signifikant zwischen den durch die Linie gekennzeichneten Boxplots; n = 5-6.

In Gegenwart von IL-1 β erhöhte SP in der Konzentration 10⁻⁸ M signifikant die Expression von *mmp-2* (Abb. 40 D) in den Kallus-Explantaten der WT-Kontrollen, die Expression von *mmp-3* wurde durch Stimulation mit 10⁻¹⁰ M SP signifikant reduziert (Abb. 40 E). Die Genexpression von *mmp-14* wurde in den Explantaten der WT-Kontrollen durch Stimulation mit SP nicht verändert (Abb. 40 F).

In den unstimulierten Kallus-Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse war die Expression der Gene *mmp-2* und -3 in Gegenwart von IL-1 β signifikant reduziert im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen (Abb. 40 D, E). Dieser Effekt konnte für die Genexpression von *mmp-2* durch Stimulation mit 10⁻⁸ M SP rückgängig gemacht werden (Abb. 40 D). Für das Gen *mmp-3* konnte in den Explantaten eine

tendenzielle Erhöhung der Genexpression auf das Level der unstimulierten WT-Kontrollen durch Stimulation mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP festgestellt werden (Abb. 40 E).

Die Expression von *mmp-14* wurde in Gegenwart von IL-1 β in den Kallus-Explantaten der unstimulierten Tac1 $^{-/-}$ Mäuse verglichen mit den unstimulierten WT-Kontrollen nicht beeinflusst. Die Stimulation mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP in Gegenwart von IL-1 β erhöhte die Expression von *mmp-14* in den Kallus-Explantaten der Tac1 $^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den unstimulierten Explantaten aus Tac1 $^{-/-}$ Mäusen und den WT-Kontrollen. Die durch die Deletion des Tachykinin-1 Gens verursachten Effekte auf die Genexpression von MMP-2, -3 und -14 sind durch Stimulation mit 10^{-8} bzw. 10^{-10} M SP sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von IL-1 β teilweise reversibel.

4.2.2.4.3 Genexpression von IL-6 und MIP-2 nach Stimulation mit SP

Die Genexpression der Entzündungsmediatoren IL-6 und MIP-2 wurde in den Kallus-Explantaten der WT-Kontrollen durch eine Stimulation mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von IL-1 β nicht signifikant beeinflusst (Abb. 41 A-D). Die Genexpression von *IL-6* war sowohl in den unstimulierten als auch den mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP stimulierten Kallus-Explantaten der Tac1 $^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen nicht signifikant verändert (Abb. 41 A). Die Expression des Gens *MIP-2* war in den Kallus-Explantaten der Tac1 $^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen tendenziell erhöht. Dieser Effekt war durch Stimulation mit beiden SP-Konzentrationen nicht reversibel (Abb. 41 B).

In Gegenwart von IL-1 β war die Genexpression von *IL-6* in den unstimulierten Explantaten der Tac1 $^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen signifikant reduziert (Abb. 41 C). Dieser Effekt konnte durch Stimulation der Kallus-Explantate von Tac1 $^{-/-}$ Mäusen mit 10^{-8} M SP signifikant und durch 10^{-10} M SP teilweise rückgängig gemacht werden. Die Expression des Gens *MIP-2* wurde in Gegenwart von IL-1 β weder durch Stimulation mit SP bzw. noch durch das Fehlen von SP beeinflusst (Abb. 41 D).

Die durch die Deletion des Tachykinin-1 Gens verursachten Effekte auf die Genexpression von IL-6 in Gegenwart von IL-1 β sind durch Stimulation mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP teilweise reversibel.

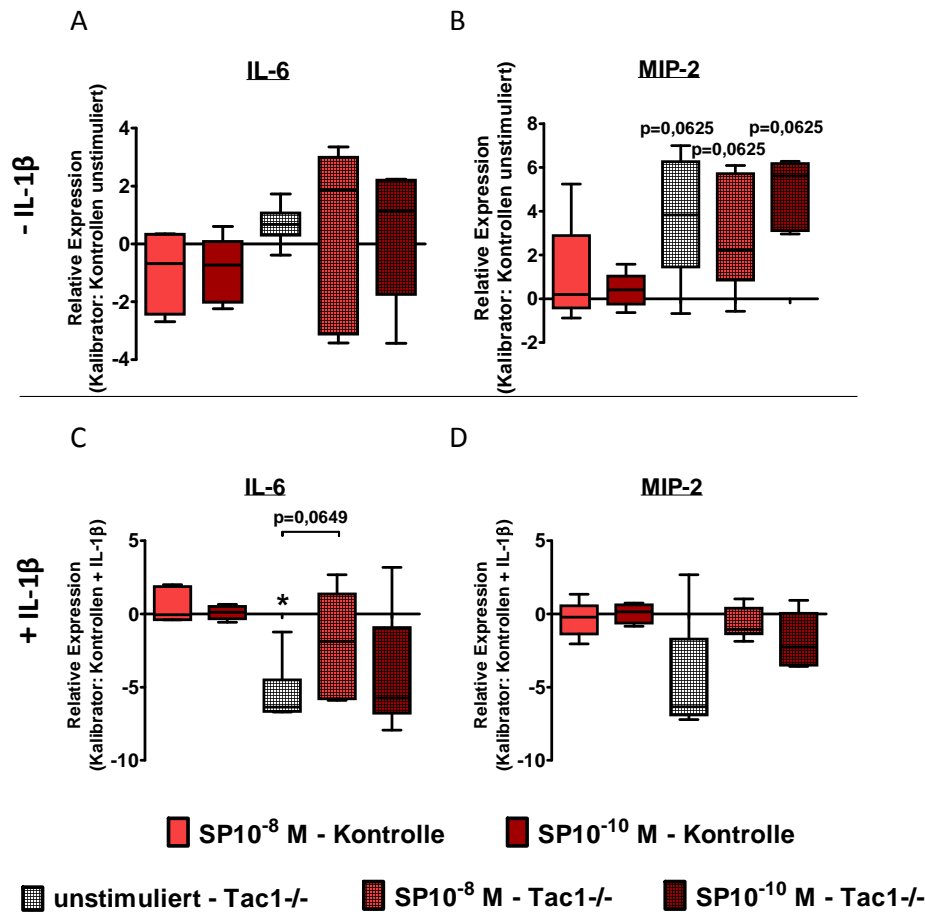


Abbildung 41: Relative Änderung der Genexpression (Logarithmus zur Basis 2) von *IL-6* (A, C) und *MIP-2* (B, D) in Kallus-Explantaten von WT-Kontrollen und *Tac1*^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit SP in den Konzentrationen 10⁻⁸ M und 10⁻¹⁰ M, in Abwesenheit (A, B) und in Gegenwart von IL-1β (0,5ng/ml) (C, D). Unstimulierten WT-Kontrollen (A-C) bzw. die WT-Kontrollen in Gegenwart von IL-1β (D-F) dienten als Kalibrator, sie wurden auf "0" normiert und werden durch die 0-Linie der Graphen (x-Achse) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; * = p ≤ 0,05; ohne Linie = signifikant zur WT-Kontrolle w/o IL-1β (= 0-Linie); mit Linie = signifikant zwischen den durch die Linie gekennzeichneten Balken; n = 5-6.

4.2.2.4.4 Genexpression von *cox-2* und *iNos* nach Stimulation mit SP

Auch für die Expression der Gene *cox-2* und *iNos* in den Kallus-Explantaten der WT-Kontrollen konnte sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von IL-1β keine signifikante Veränderung durch eine Stimulation mit 10⁻⁸ M/ 10⁻¹⁰ M SP beobachtet werden (Abb. 42 A-D). Die Genexpression von *cox-2* war in den Explantaten der *Tac1*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen tendenziell erhöht (Abb. 42 A), dieser Effekt konnte durch Stimulation mit 10⁻¹⁰ M SP teilweise rückgängig gemacht werden. Die Stimulation mit 10⁻⁸ M SP zeigte keinen Effekt. Die Genexpression der *iNos* war in den Kallus-Explantaten der *Tac1*^{-/-} Mäuse signifikant reduziert im Vergleich zu den

unstimulierten WT-Kontrollen (Abb. 42 B), die Stimulation mit 10^{-8} M/ 10^{-10} M SP konnte diesen Effekt teilweise wieder rückgängig machen.

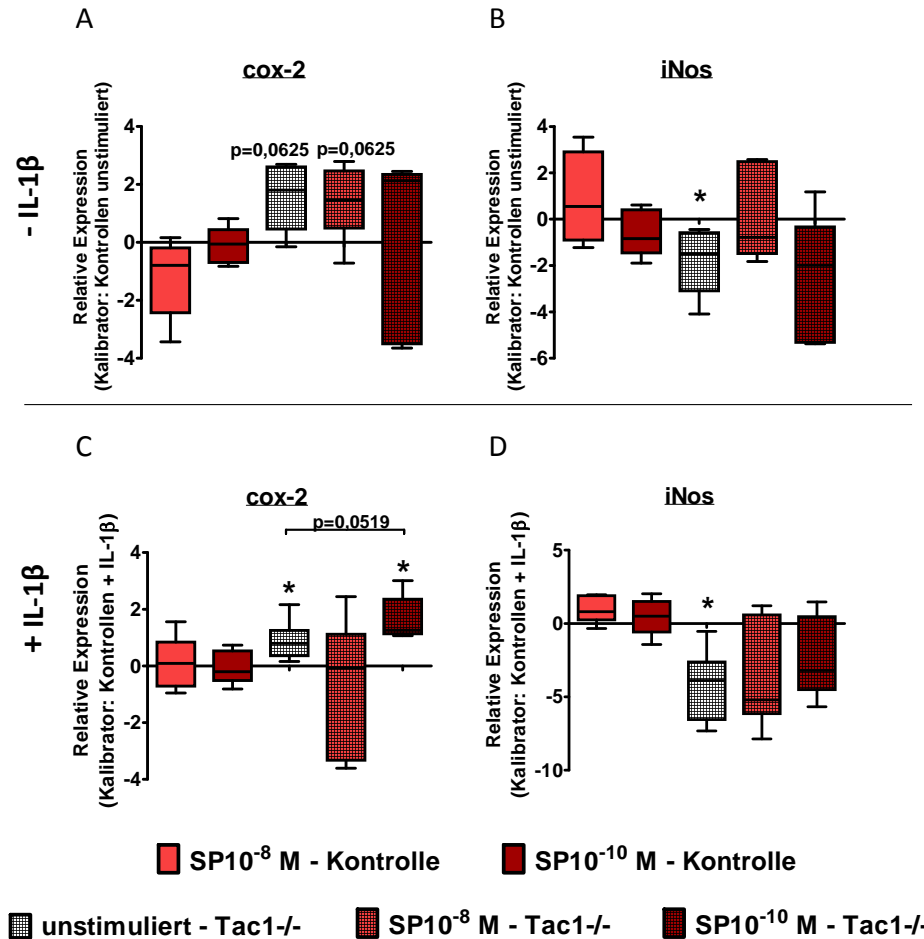


Abbildung 42: Relative Änderung der Genexpression (Logarithmus zur Basis 2) von *cox-2* (A, C) und *iNos* (B, D) in Kallus-Explantaten von WT-Kontrollen und Tac1^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit SP in den Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-10} M, in Abwesenheit (A, B) und in Gegenwart von IL-1 β (0,5 ng/ml) (C, D). Unstimulierten WT-Kontrollen (A-C) bzw. die WT-Kontrollen in Gegenwart von IL-1 β (D-F) dienen als Kalibrator, sie wurden auf "0" normiert und werden durch die 0-Linie der Graphen (x-Achse) dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; * = $p \leq 0,05$; ohne Linie = signifikant zur WT-Kontrolle w/o IL-1 β (= 0-Linie); mit Linie = signifikant zwischen den durch die Linie gekennzeichneten Balken; n = 5-6.

In Gegenwart von IL-1 β war die Expression von *cox-2* in den unstimulierten Explantaten der Tac1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 42 C). Die Stimulation der Tac1^{-/-} Explantate mit 10^{-8} M SP konnte diesen Effekt teilweise rückgängig machen, durch Stimulation mit 10^{-10} M SP wurde die Genexpression von *cox-2* jedoch noch weiter erhöht. In

Ergebnisse

Gegenwart von IL-1 β war die Expression von iNos in den unstimulierten Explantaten der Tac1 $^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen signifikant reduziert (Abb. 42 D). Dieser Effekt war durch Stimulation der Explantate von Tac1 $^{-/-}$ Mäusen mit 10^{-8} M / 10^{-10} M SP reversibel.

Die durch die Deletion des Tachylinin-1 Gens verursachten Effekte auf die Genexpression von Cox-2 und iNos sind durch Stimulation mit 10^{-8} M / 10^{-10} M SP sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von IL-1 β teilweise reversibel.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Tachykinin-1-defizienten (kein SP) und chemisch sympathektomierten (SyX-) Mäusen der Einfluss des sensiblen Neurotransmitters SP und des gesamten SNS auf die Frakturheilung und die Reparatur-bedingte Knochenneubildung in einem adulten Modell für enchondrale Ossifikation in der Maus untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl das sensible Nervensystem durch seinen Neurotransmitter SP als auch das sympathische Nervensystem die Kallusbildung und -reifung sowie den Heilungsverlauf nach einer Fraktur modulieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Knochenmetabolismus unter physiologischen Bedingungen durch das Fehlen des Neurotransmitters SP und durch die Reduktion der Konzentration sympathischer Neurotransmitter erheblich beeinflusst wird.

5.2 SP- und NK1R-Immunoreaktivität der Zellen im Kallusgewebe

In der intakten Tibia sind SP-positive Nervenfasern hauptsächlich im Periost und im vaskularisierten Gewebe zu finden. Nach einem Trauma wird die Innervierung des verletzten Gewebes mit sensiblen, SP-positiven Nervenfasern stark induziert, jedoch nicht in der frühen Phase der Knochenheilung, die Innervierungsrate der Nervenfasern steigt zeitgleich mit der Neovaskularisierung des Gewebes an (Aoki et al. 1994, Imai and Matsusue 2002). Auch wir konnten im frühen Heilungsverlauf 5 Tage nach dem Setzen der Fraktur keine SP-positiven Nervenfasern im Kallusgewebe finden. Wir konnten jedoch feststellen, dass mesenchymale Zellen endogen von Beginn der Chondrogenese bis zum Beginn der terminalen Differenzierung SP produzieren. Hypertrophierende Chondrozyten scheinen die Produktion von SP wieder zu verringern. Ebenso wurde der NK1R von differenzierenden mesenchymalen Zellen sowie proliferierenden und auch hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Chondrozyten sind also in der Lage sich autokrin und das umliegende Gewebe, bez. Zellen, parakrin über den SP/NK1R-vermittelten Signalweg zu beeinflussen. Eine ähnliche Beobachtung, jedoch bezogen auf das sympathische Nervensystem, wurde von Capellino et al. beschrieben. Im Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis verschwinden TH-positive sympathische Nervenfasern während der Entzündungsreaktion aus dem Gewebe. Stattdessen konnten TH-positive Zellen im entzündeten Synovialgewebe gefunden werden. Capellino et al. vermuten, dass die Zellen auf Grund des lokalen Verschwindens der sympathischen Nervenfasern und der damit sinkenden Katecholaminkonzentration mit der Produktion der TH und damit vermutlich auch mit der Produktion von Katecholaminen beginnen, welche zu dem Zeitpunkt einen anti-inflammatorischen Effekt ausüben (Capellino et al. 2010). Ein Mechanismus, der auch für das Auftreten der SP/NK1R-positiven

Chondrozyten im Frakturkallus denkbar ist, da das knorpelige Gewebe der Chondrozyten nicht von sensiblen Nervenfasern innerviert wird. Der fehlende Einfluss sensibler Nervenfasern im Softkallus könnte durch die endogene SP-Produktion der Chondrozyten kompensiert werden. Im Verlauf der Kallusdifferenzierung kalzifizieren hypertrophe Chondrozyten die Knorpelmatrix, welche so durch eine knöchernen Matrix ersetzt wird. Zu diesem Zeitpunkt beginnen sensible Nervenfasern in Verbindung mit Blutgefäßen in das Gewebe einzuwachsen. Im Verlauf der prä-hypertrophen zur hypertrophen Differenzierung verringert sich auch die endogene Produktion von SP in den Chondrozyten. Ein möglicher Effekt von SP könnte dabei eine Induktion der Zellproliferation sein, der bereits für Chondrozyten aber auch für MSCs und Osteoblasten *in vitro* beschrieben wurde (Liu et al. 2007, Nilsson et al. 1985, Opolka et al. 2012).

Durch die chemische Inhibierung des sympathischen Nervensystems wäre eine Verschiebung des Neurotransmitter-Gleichgewichts hin zu einem erhöhten „SP-Signaling“ denkbar, vergleichbar wie der Mechanismus, der während der chronischen intestinalen Entzündung (Morbus Crohn) beschrieben wurde. Der Verlust sympathischer Nervenfasern im Intestinum wurde hier im Zusammenhang mit einer Zunahme an SP-positiven Nervenfasern beschrieben wodurch überwiegend sensible, proinflammatorische Effekte vermittelt wurden (Straub et al. 2008). Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Expression von SP und dessen Rezeptor NK1 in den Frakturkalli der SyX-Mäuse untersucht. Wir konnten jedoch keine Veränderungen im Expressionsmuster von SP oder dem NK1R im Vergleich zu den WT-Kontrollen feststellen. Auch im mesenchymalen Kallusgewebe der SyX-Mäuse konnten wir SP- und NK1R-positive Zellen 5 Tage nach Fraktur detektieren. Wie im WT-Kallus wird die endogene SP-Produktion in den Chondrozyten im Verlauf der hypertrophen Differenzierung gestoppt; die Expression des NK1R konnte in den Frakturkalli der SyX-Mäusen vergleichbar den WT-Kontrollen auch noch in hypertrophen Chondrozyten detektiert werden. Wir denken, dass das Neurotransmitter-Milieu bezüglich der Konzentration an SP in der Peripherie des Frakturkallus durch die Sympathektomie nicht maßgeblich verändert wird und mit den WT-Kontrollen vergleichbar ist. Die Expression und Lokalisation von SP und dem NK1R scheint in den SyX-Mäusen und den WT-Kontrollen gleich zu sein.

5.2 TH-positive Nervenfasern und α 1D-, α 2B- und β 2-Adrenozeptor-Immunoreaktivität der Zellen im Kallusgewebe

Der unfrakturierte Knochen wird von TH-positiven, katecholaminergen Nervenfasern innerviert, meist befinden sie sich in der Nähe von Blutgefäßen oder in den Epithelwänden der Gefäße (Bjurholm et al. 1988b). Wir konnten TH-immunoreaktive Nervenfasern 5 Tage nach Fraktur im mesenchymalen Kallusgewebe detektieren. Im Verlauf des Heilungsprozesses zogen sich die TH-

positiven Nervenfasern aus dem mesenchymalen Kallusgewebe zurück und konnten bis 13 Tage nach Fraktur nur noch im Periost detektiert werden, das Knorpelgewebe war nicht innerviert. Durch ein Trauma werden vorhandene Nervenfasern in der direkten Umgebung des Frakturspalts verletzt. Li und Kollegen zeigten, dass sich diese Nervenfasern schon kurze Zeit nach dem Trauma zu regenerieren begannen (Li et al. 2001), was unsere Beobachtungen bestätigt. Es konnten zwar keine TH-positiven Zellen im Frakturkallus detektiert werden, jedoch fanden wir α 1D- und α 2B-Adrenozeptor (AR) exprimierende Zellen im mesenchymalen und knorpeligen Kallusgewebe. Zellen, welche den α 1D-AR exprimierten konnten nur im mesenchymalen Kallus detektiert werden, der α 2B-AR hingegen wurde auch von Chondrozyten im knorpeligen Softkallus exprimiert. Die Nähe der Nervenfasern zu mesenchymalen und chondroiden Zellen im Kallusgewebe und die Tatsache, dass diese Zellen Adrenozeptoren exprimieren, lässt eine Rezeptor-basierte Interaktion zwischen den neuronalen Mediatoren der sympathischen Nervenfasern und der Zellen vermuten, wie auch schon von Li et al. propagiert wurde (Li et al. 2001). Kostale Chondrozyten, die in Pellets kultiviert wurden, exprimierten mRNA aller AR-Subtypen (Opolka et al. 2012). Im Kallusgewebe konnten wir jedoch keine β 2-AR-positiven Zellen nachweisen. Die Unterschiede bezüglich der Rezeptorexpression können jedoch auf der Herkunft der Zellen und der *in situ* versus *in vitro* Analysen beruhen.

TH-immunoreaktive Nervenfasern wurden auch in Geweben im Frakturbereich der Tac1^{-/-} Mäuse untersucht, um zu testen, ob die Häufigkeit und die Lokalisation der sympathischen, TH-positiven Nervenfasern im Kallusumgebungsbereich durch die SP-Defizienz verändert wurde. Wir konnten keine Unterschiede von TH-immunoreaktiver Nervenfasern im Vergleich zu WT-Mäusen feststellen. Auch im mesenchymalen Kallusgewebe von Tac1^{-/-} Mäusen konnten 5 Tage nach Fraktur TH-positive Nervenfasern detektiert werden, 13 Tage nach Fraktur konnten nur noch im Periost TH-positive Nervenfasern nachgewiesen werden.

5.3 Bewegungsverhalten gesunder Mäuse und das Schmerzempfinden nach Fraktur in SyX- und Tachykinin-1 -defizienten Mäusen

Eine grundlegende Bedingung für eine vergleichende *in vivo*-Analyse der Kallusreifung zwischen SyX-, Tac1^{-/-} Mäusen und WT-Kontrollen, basiert auf einer vergleichbaren Belastung der Beine. Die Kallusbildung und die Geschwindigkeit des Heilungsprozesses hängen entscheidend von den mechanischen Bedingungen während der Frakturheilung ab. Veränderungen der mechanischen Stimuli beeinflussen die Kallusreifung und den Heilungsverlauf und dies scheint vor allem in der frühen Phase der Frakturheilung ausschlaggebend für den weiteren Prozess zu sein (Claes et al. 1995, Goodship et al. 1998, Yamagishi and Yoshimura 1955). Würden die Mäuse durch das Fehlen von SP bzw. der chemischen Sympathektomie eine veränderte Mobilität aufweisen, würden sich diese

Diskussion

Unterschiede zwingend auf den Heilungsverlauf auswirken. Die Ergebnisse der Bewegungsanalysen zeigen, dass sich SyX-, Tac1-/- Mäuse und WT-Kontrolltiere im Schnitt mit der gleichen Geschwindigkeit bewegen und eine ähnliche Laufstrecke zurücklegen. Es kann davon ausgegangen werden, dass vor dem Setzen der Frakturen für alle drei Mausgruppen die gleichen Bedingungen in Bezug auf die Belastung der Beine vorherrschen. Diese Beobachtung wird durch Analysen des Berührungsempfindens (= Schmerzempfinden) der Pfoten nicht-traumatisierter Mäuse untermauert. Messungen an beiden Hinterpfoten unmittelbar vor Setzen der Frakturen zeigten keine Unterschiede im Berührungsverhalten zwischen den drei Mausgruppen.

SP spielt eine Rolle als Neuromodulator bei der Signalübertragung von Schmerzen, auch nach einer Fraktur ist SP an der Empfindung und Übertragung schmerzhafter Reize beteiligt (Cao et al. 1998, Li et al. 2012). Wei et al. konnten zeigen, dass die Genexpression von SP in frakturierten Rattenbeinen erhöht war, ebenso wie die Proteinkonzentration im Ischiasnerv und im Serum. Diese übermäßige Aktivierung des SP-Signalwegs über den NK1R führte nach einem Trauma zur Entstehung des Komplexen Regionalen Schmerzsyndroms (CRPS). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Übertragung schmerzhafter Reize in den Tac1-/- Mäusen durch das Fehlen von SP beeinflusst wird. Die Analysen des Berührungsempfindens (= Schmerzempfinden) in den frakturierten Beinen der Tac1-/- Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen bestätigten diese Vermutung. Das Berührungsempfinden in den frakturierten Beinen war 5 Tage nach dem Setzen der Fraktur in Tac1-/- Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen und den SyX-Mäusen signifikant geringer. Tac1-/- Mäuse empfinden während des frühen Heilungsprozesses vermutlich weniger Schmerzen. Im Vergleich zu den WT-Kontrollen und den SyX-Mäusen könnten Tac1-/- Mäuse die frakturierten Beine auf Grund des geringeren Schmerzempfindens wahrscheinlich bereits kurze Zeit nach dem Setzen der Frakturen häufiger und stärker belasten. 8 Tage nach Fraktur und in den kontralateralen, nicht-frakturierten Beinen konnte kein Unterschied im Berührungsempfinden zwischen Tac1-/- Mäusen und WT-Kontrollen festgestellt werden. SP scheint 8 Tage nach Fraktur keinen Einfluss mehr auf das Berührungsempfinden in den frakturierten Beinen auszuüben. Zudem könnte das Neuropeptid CGRP, welches häufig mit SP in sensiblen Nervenfasern kolokalisiert (Bjurholm et al. 1988a) und an der Übertragung schmerzhafter Impulse beteiligt ist (Woolf and Wiesenfeld-Hallin 1986) zur Normalisierung des Schmerzempfindens zu diesem Zeitpunkt beitragen.

Die chemische Sympathektomie änderte das Berührungsempfinden im Vergleich zu den WT-Kontrollen in der frühen Phase (bis 5 Tage) nach Fraktur nicht. 8 Tage nach Fraktur konnten wir jedoch ein reduziertes Berührungsempfinden in den SyX-Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen und den Tac1-/- Mäusen messen. Eine Sympathektomie führt in der Peripherie zu einer ca. 80 %tigen Reduktion sympathischer Neurotransmitter wie Noradrenalin. In niedrigen Konzentrationen (10^{-7} - 10^{-9}

M) bindet Noradrenalin hauptsächlich an α -AR, in hohen Konzentrationen (10^{-5} - 10^{-7} M) aktiviert es den β -AR-basierten Signalweg (Straub et al. 2006). *In vitro* Analysen mit Makrophagen und humanen Monozyten zeigten, dass die Aktivierung der unterschiedlichen Adrenozeptoren die Produktion von Entzündungsmediatoren beeinflusst. Stimulierung der α -AR erhöhte die Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)-Produktion, wohingegen die Aktivierung der β -AR die Produktion des TNF- α inhibierte (Spengler et al. 1994). Die Reduktion der sympathischen Neurotransmitter bewirkte jedoch 8 Tage nach Fraktur keine proinflammatorische Wirkung, was eher zu einem erhöhtem Schmerzempfinden führen würde, sondern reduzierte das Schmerzempfinden. Das SNS scheint in Bezug auf Entzündungsreaktionen eine bimodale Rolle einzunehmen. Sowohl das sensible-, wie auch das sympathische Nervensystem beeinflussen eine akute Entzündungsreaktion, wobei das SNS sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Effekte ausüben kann. Härle et al. konnten dies in ihren Studien zur rheumatoiden Arthritis zeigen. Während der initialen Phase der Entzündung förderte das SNS die Entzündungsreaktion, in der späten Phase der Krankheit übte das SNS a priori antiinflammatorische Effekte aus (Harle et al. 2005). Während der frühen Phase der Frakturheilung scheint die Entzündungsreaktion in SyX-Mäusen durch das sensible Nervensystem vermittelt zu werden, wodurch die Mäuse ein vergleichbares Schmerzempfinden wie die WT-Kontrollen aufweisen. Nach dem Abklingen der Entzündungsphase (8 Tage nach Fraktur), reduziert die Ablation des SNS jedoch das Berührungsempfinden in den SyX-Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass ein intaktes SNS zu diesem Zeitpunkt einen proinflammatorischen Stimulus ausüben könnte, der durch die chemische Sympathektomie wegfällt. Die reduzierte Konzentration an noch vorhandenen sympathischen Neurotransmittern scheint, ähnlich einer Beobachtung in einem Model mit chronischer Colitis, einen antiinflammatorischen Effekt zu bewirken (Straub et al. 2008). Eine mögliche Ursache für die bimodale Rolle des SNS bei Entzündungsreaktionen könnte die Signaltransduktion sympathischer Neurotransmitter via α - und β -AR sein. Diese kann über unterschiedliche Mechanismen laufen, je nachdem welche Untereinheit des G-Protein-gekoppelten Rezeptors aktiviert wird und welcher adrenerge Subtyp angesprochen wird. Der β -AR kann sowohl den stimulatorischen, cAMP-vermittelten Signalweg ansprechen, aber auch den inhibitorischen *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-basierten Signalweg. Ebenso können α -Adrenozeptoren unterschiedliche *second messengers* (sekundäre Botenstoffe) aktivieren (Jenei-Lanzl et al. 2014a, Graham et al. 1996, Rosenbaum et al. 2009).

5.4 Die Deletion des Tachykinin-1 Gens und die SyX beeinflussen den Ablauf der Kallusreifung *in vivo*

Unsere Daten zeigen, dass sowohl das Fehlen von SP wie auch die Reduktion sympathischer Neurotransmitter die Kallusreifung und somit die Frakturheilung modulieren kann.

Die Vermessung der Frakturkalli von SyX-Mäusen ergab keine Unterschiede im Vergleich zu den WT-Kontrollen, es wurden ähnliche Ergebnisse für das Volumen, das Gewicht und die Dichte ermittelt. Die Frakturkalli von Tac1^{-/-} Mäusen hatten jedoch ein geringeres Volumen und eine deutlich höhere Dichte. Klein et al. zeigten, dass sich der Kallus-Durchmesser signifikant verringerte, wenn zu Beginn des Heilungsprozesses ein größeres Maß an interfragmentären Bewegungen zwischen den Frakturrenden zugelassen wurde. Hohe interfragmentäre Bewegungen führten zur Bildung eines kleineren Kallus, ein normales Maß an interfragmentären Bewegungen führte zur Bildung eines größeren Kallus (Klein et al. 2003). Wir vermuten, dass das geringere Kallus-Volumen der Tac1^{-/-} Mäuse durch eine höhere Belastung der frakturierten Beine und folglich größere interfragmentäre Bewegungen in der initialen Phase der Heilung auf Grund des reduzierten Schmerzempfindens entstanden ist. Die Denervierung sensibler Nervenfasern vor dem Setzen der Fraktur durch eine Capsaicin-Behandlung im Frakturmodell bei der Ratte, ergab entgegen unserer Beobachtungen eine geringere Dichte und einen größeren Kallus-Durchmesser (Apel et al. 2009). Die entgegengesetzten Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass durch die sensible Denervierung nicht nur die SP-vermittelten Effekte ausgeschaltet werden, sondern auch Effekte weiterer sensibler Neurotransmitter wie z.B. CGRP, welches häufig mit SP in sensiblen Nervenfasern kolokalisiert werden konnte (Bjurholm et al. 1988a).

Weiterhin wurde die Gewebezusammensetzung in den Frakturkalli untersucht und zwischen den drei Mausgruppen verglichen. Unsere Studien zeigten, dass die Frakturkalli der SyX-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren kurze Zeit nach der Fraktur (Tag 5) aus einem größeren Anteil an mesenchymalem Kallusgewebe und einem geringeren Anteil an knorpeligem Softkallus bestanden. Im späteren Verlauf, Tag 9 und 13 nach Fraktur, hatten sich die Anteile des mesenchymalen und des knorpeligen Kallusgewebes wieder an die Ergebnisse der WT-Kontrollen angeglichen. Wir nehmen an, dass die Ablation des SNS und die daraus resultierende Reduktion der sympathischen Neurotransmitter die Differenzierung des mesenchymalen Kallusgewebes hin zum knorpeligen Kallusgewebe und somit den Reifeprozess des Frakturkallus verzögert. Jenei-Lanzl et al. zeigten in ihren Studien, dass die exogene Stimulierung von mesenchymalen Zellen und Chondroprogenitorzellen, kultiviert in Pelletkulturen, mit hohen Konzentrationen an Noradrenalin (10^{-6} M), wodurch hauptsächlich β -Adrenozeptoren aktiviert werden, die Produktion der knorpeligen Matrixkomponenten Kollagen II und der Glykosaminoglykane inhibierte. Zudem steigerte die

Stimulation mit Noradrenalin über den β -Adrenozeptor-basierten Signalweg die Expression hypertropher Marker wie Kollagen X und MMP-13 und beschleunigte die hypertrophe Differenzierung im Verlauf der Chondrogenese. (Jenei-Lanzl et al. 2014b). Wir konnten keine β -Adrenozeptor exprimierenden Zellen im Frakturkallusgewebe detektieren, wodurch wir vermuten, dass im Verlauf der Frakturheilung hauptsächlich α -Adrenozeptor-basierte Effekte eine Rolle spielen. Die Fläche hypertropher Chondrozyten im knorpeligen Kallusgewebe der SyX-Mäuse war zum Zeitpunkt an dem die Mineralisierung der Knorpelmatrix beginnt, im Vergleich zu den WT-Kontrollen signifikant reduziert. Die Aktivierung des α -Adrenozeptor-basierten Signalwegs durch geringe Konzentrationen an sympathischen Neurotransmittern scheint die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Zellen und den Beginn der Hypertrophie zu verzögern. Diese Beobachtung passt zu den Daten von Jenei-Lanzl et al., wo die Stimulation mit hohen Dosen Noradrenalin die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten über β -Adrenozeptoren beschleunigt (Jenei-Lanzl et al., 2014b). Das Fehlen des sensiblen Neurotransmitters SP zeigte zu keinem Zeitpunkt modulierende Effekte bezüglich der Gewebeanteile am gesamten mesenchymalen, knorpeligen und knöchernen Kallusgewebe, welche sich nicht von den WT-Kontrollen und den SyX-Mäusen unterschieden. Allerdings konnten wir 13 Tage nach Fraktur, wenn die Matrixmineralisierung des Softkallus einsetzt, eine Reduktion der Fläche hypertropher Chondrozyten innerhalb des knorpeligen Kallusgewebes im Vergleich zu den WT-Kontrollen feststellen. Die SP-vermittelte Signalübertragung scheint den terminalen Reifungsprozess der Chondrozyten zu modulieren. Opolka et al. zeigten, dass die Stimulation von kostalen Chondrozyten in Pelletkulturen mit SP die Genexpression von *mmp-13* induzierte, nicht aber die Expression von *Col X* (Opolka et al. 2012). Das SNS scheint mehr Einfluss auf den gesamten Prozess der chondrogenen Differenzierung inklusive der hypertrophen Phase zu haben, wohingegen SP nur die terminale hypertrophe Phase der chondrogenen Differenzierung zu modulieren scheint.

5.5 Die Deletion des Tachykinin-1 Gens beeinflusst die biomechanischen und strukturellen Knochenparameter in frakturierten und nicht-frakturierten Beinen

In einem Frakturmodell, das an ovariectomierten Mäusen durchgeführt wurde, stellten Ding und Kollegen eine reduzierte Konzentration an SP im Frakturkallus fest. Im Rahmen der Studie konnten sie verschlechterte biomechanische Eigenschaften in den frakturierten Beinen dieser Mäuse feststellen (Ding et al. 2010). Die Daten dieser Studie unterstützen unsere Beobachtungen der biomechanischen Eigenschaften, die für *Tac1*^{-/-} Mäuse ermittelt wurden. Die Femora der *Tac1*^{-/-} Mäuse haben 21 Tage nach Fraktur einem geringeren Drehmoment standgehalten und es konnte ein größerer Torsionswinkel gemessen werden im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Doch auch in den

Diskussion

kontralateralen, nicht-frakturierten Femora wurden eine geringere Widerstandskraft gegen das Drehmoment und ein erhöhter Torsionswinkel sowie eine verringerte Stabilität des Knochens ermittelt. Die Daten zeigen, dass SP bei der Regulation der physiologischen Knochenbildung und dem Erhalt der Integrität und Stabilität des Knochens eine entscheidende Rolle spielt. Analysen von Kingery et al. bestärken diese Annahme; sie durchtrennten den Ischiasnerv in Ratten, woraufhin sich die SP Konzentration im denervierten Bein um 50% reduzierte. Auch die Knochendichte in diesen Beinen war deutlich reduziert. Den Beweis für die Annahme, dass die Effekte durch den Verlust von SP vermittelt wurden, brachte eine chemische Blockade des NK1R welche zu einem zusätzlichen Verlust der Knochenmasse führte. Interessant war die Beobachtung, die sie im kontralateralen unbehandelten Bein machten. Sie verglichen die SP-vermittelte Extravasationsantwort von Proteinen ins Gewebe und fanden, dass sich die Konzentration an SP im Ischiasnerv auch in den kontralateralen, nicht-denervierten Beinen verringert hatte. Sie konnten zudem, ähnlich wie in unseren Analysen, eine reduzierte Knochenqualität messen (Kingery et al. 2003). Unsere μ Ct-Analysen ergaben, dass die Qualität des Knochens in nicht-frakturierten Femora von Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen deutlich vermindert war. Dies zeigte sich in einer geringeren Trabekelzahl, Trabekeldicke, Konnektivität und Knochenmasse sowie einem erhöhten Trabekelabstand.

Die Injektion von Capsaicin bewirkt eine drastische Reduktion SP-immunoreaktiver Nervenfasern. Der Capsaicin-bedingten Verlust von SP führte zu einer ähnlichen Änderung der strukturellen Parameter wie in den Knochen der Tac1^{-/-} Mäuse. Die Trabekeldicke, die Konnektivität und die Knochenmasse waren im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren stark reduziert (Offley et al. 2005).

Die SP-vermittelten Veränderungen der strukturellen Mikroarchitektur des Knochens können durch Effekte auf die Knochenbildung und/oder durch Effekte auf die Knochenresorption entstehen. *In vitro* Analysen der, aus den Knochenexplantaten von Tac1^{-/-} Mäusen isolierten Osteoblasten, zeigten - vermutlich wegen der relativ geringen Anzahl an unabhängigen Experimenten - keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den WT-Kontrollen, sie schienen jedoch vermehrt zu proliferieren. Die tendenziell erhöhte Apoptoserate in Osteoblasten aus Tac1^{-/-} Mäusen lässt darauf schließen, dass der stimulierende Effekt auf die Proliferation letztlich keinen positiven Effekt auf die Knochenbildung hat. Auch die Matrix-bildende Aktivität (ALP-Aktivität) der Osteoblasten aus Tac1^{-/-} Mäusen schien nur in geringem Maße beeinträchtigt zu sein. Einige Studien untersuchten, welchen Einfluss die Stimulation mit SP auf die Knochenbildung *in vitro* ausübte, die Ergebnisse sind teilweise kontrovers. Adamus und Dabrowski beschrieben einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation osteogen differenzierte Stammzellen aus dem Knochenmark von Ratten (*bone marrow stromal cells*/BMSCs) bei einer Konzentration von 10^{-10} M SP. Höhere Konzentrationen zeigten keine Wirkung (Adamus and Dabrowski 2001). Die Ergebnisse der Studie von Wang et al. hingegen zeigten einen Proliferations-

fördernden Effekt auf murine Osteoblasten-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark bei hohen Konzentrationen von SP (10^{-8} M) (Wang et al. 2009). Unterschiede in den Kultivierungsmethoden und der Herkunft der isolierten Zellen könnten zu den Unterschieden in den Ergebnissen geführt haben. Adamus und Dabrowski kultivierten isolierte Ratten-BMSCs direkt in osteogenem Medium, wohingegen Wang und Kollegen zu Beginn ein Wachstumsmedium für die, aus der Maus isolierten, BMSCs verwendeten. In unseren *in vitro* Analysen wurden bereits differenzierte Osteoblasten aus Knochenexplantaten isoliert. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Proliferationsanalysen womöglich nicht in den gleichen Stadien der osteogenen Differenzierung, was auf einen Zeit und Dosis-abhängigen Effekt der Wirkung von SP hindeutet. Prinzipiell scheinen die Effekte von SP auf die Fähigkeit der Osteoblasten Knochen zu bilden von der Konzentration des Neurotransmitters abzuhängen. In Konzentration $> 10^{-8}$ M stimuliert SP die Osteoblastendifferenzierung und steigert die Matrixmineralisierung durch Erhöhung der ALP-Aktivität und vermehrter Kalziumablagerung (Goto et al. 2007, Wang et al. 2009). In geringeren Konzentrationen $< 10^{-8}$ M blockiert SP die Differenzierung der Zellen zu reifen, Matrix-bildenden Osteoblasten (Adamus and Dabrowski 2001). Das Fehlen von SP blockierte auch in den Frakturkalli der Tac1^{-/-} Mäuse die Osteoblastendifferenzierung. Im Vergleich zu WT-Kontrolltieren konnten wir in drei der vier analysierten Frakturkalli von Tac1^{-/-} Mäusen eine Reduktion der Osteoblastenzahl um 50% feststellen. Zusammengefasst lassen die Daten vermuten, dass SP einen positiven Effekt auf die Knochenbildung ausübt, wenn es in höheren Konzentrationen im Gewebe vorkommt, eine geringe SP-Konzentration oder das Fehlen des Neurotransmitters wirken sich dagegen negativ auf die Knochenbildung aus (Abb. 42).

Hill et al. analysierten nach Capsaicin-Behandlung ihrer Ratten den Knochenumbau durch Osteoklasten. Aktiviert wurde der *Remodelling*-Prozess durch das Entfernen einiger Mahlzähne. Die Reduktion der SP-positiven Nervenfasern im Gewebe führte zu einer Reduktion der von Osteoklasten bedeckten Knochenfläche der Mandibeln um 21,2% im Vergleich zu Kontrollen (Hill et al. 1991). Diese Ergebnisse unterstützen Daten, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden. Wir konnten, verglichen mit den WT-Kontrolltieren und den SyX-Mäusen, eine signifikante Reduktion der Anzahl TRAP-positiver Osteoklasten in der knöchernen Matrix der Frakturkalli von Tac1^{-/-} Mäusen feststellen. Eine mögliche Ursache für die geringere Anzahl an Osteoklasten könnte eine erhöhte Apoptoserate sein. Die *in vitro* Analysen der Osteoklasten aus Tac1^{-/-} Mäusen zeigten eine tendenziell höhere Apoptoserate im Vergleich zu den WT-Kontrollen und eine signifikant erhöhte Apoptoserate verglichen mit den SyX-Mäusen. Offley und Kollegen untersuchten ebenfalls die Auswirkungen einer Capsaicin-Behandlung auf die Anzahl an Osteoklasten. Sie fanden -konträr zu unseren und Hill's Beobachtungen- eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten sowie eine größere, mit Osteoklasten bedeckte Fläche der Knochenmatrix (Offley et al. 2005). Die Diskrepanz zu unseren

Diskussion

Daten und den Ergebnissen von Hill et al. könnte zum einen durch das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Behandlung bedingt sein. Durch die Deletion des Tachykinin1 Gens fehlt SP schon während der Embryogenese, es können daher zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung Effekte von SP-vermittelt werden. Hill und Kollegen eliminierten die SP-immunoreaktiven Nervenfasern durch die Capsaicin-Behandlung auch bereits kurze Zeit nach der Geburt. Zudem wurde in unseren Analysen sowie in der Studie von Hill et al. ein Knochen-*Remodelling*-Prozess durch das Setzen der Frakturen bzw. das Entfernen der Molaren induziert (Hill et al. 1991). Die Analysen von Offrey et al. beziehen sich dagegen auf unbehandelte Knochen von adulten, Capsaicin-behandelten Ratten (Offrey et al. 2005). Wir vermuten, dass der Zeitpunkt im Verlauf der Knochenentwicklung, an dem die SP-vermittelte Signaltransduktion inhibiert wird, Auswirkungen auf den Knochenumbau hat.

Die Stimulation mit SP scheint die Differenzierung von BMMs zu multinukleären, TRAP-positiven Osteoklasten erheblich zu aktivieren (Wang et al. 2009). Wir vermuten, dass der stimulierende Effekt auf die Osteoklastogenese nicht ausschließlich über eine direkte Wirkung von SP auf die Osteoklasten, sondern auch indirekt, vermittelt wird. In Osteoblasten fördert die Stimulation mit SP die Produktion von Osteoklastogenese-fördernden Faktoren wie RANKL und Cox-2 (Kojima et al. 2006). Ein Effekt, der ebenso für Fibroblasten aus der Synovia beschrieben wurde und mit zum Verlust von subchondraler Knochenmatrix während der rheumatoiden Arthritis beiträgt (Matayoshi et al. 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Einflusses von SP auf den Knochenmetabolismus sowie die in der Literatur beschriebenen Daten führen uns zu der Annahme, dass die Beeinträchtigung der Knochen-Mikroarchitektur der *Tac1*^{-/-} Mäuse auf eine Reduktion der Knochenbildung zurückzuführen ist. Die verringerte Rate der Knochenbildung kann jedoch nicht durch die ebenfalls reduzierte Osteoklastogenese und den dadurch verringerten Abbau der Knochenmatrix ausgeglichen werden. Wie der Mechanismus in Abb. 42 darstellt, ist das Resultat ein „Netto-Verlust“ an Knochenmasse.

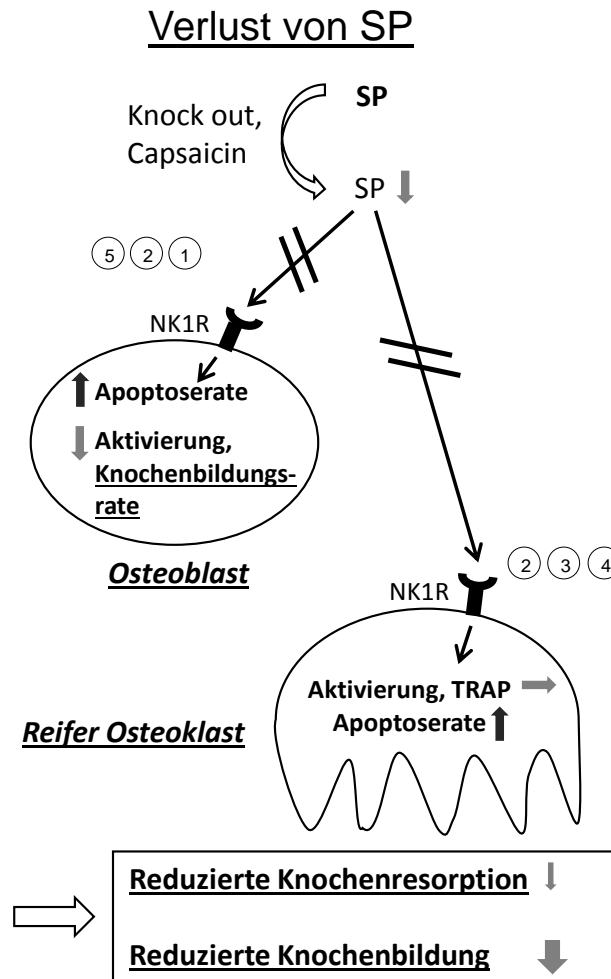


Abbildung 43: Zusammenfassung der Mechanismen, die durch das Fehlen von SP zu den Änderungen der strukturellen Knochenparameter führen. Die fehlende Signaltransduktion durch SP via des NK1R führt zu einer reduzierten Anzahl und reduzierten Aktivität der Osteoklasten. Dies führt zu einer Verringerung der Knochenresorptionsrate. Zusätzlich ist die Proliferationsrate der Osteoblasten sowie deren Aktivität reduziert, woraus eine erheblich verminderte netto Knochenbildungsrate resultiert. Literatur: 1) (Adamus and Dabrowski 2001); 2) (Wang et al. 2009); 3) (Hill et al. 1991); 4) (Kojima et al. 2006); 5) (Goto et al. 2007).

5.6 Eine Syx beeinflusst die biomechanischen und strukturellen Knochenparameter in frakturierten und nicht-frakturierten Beinen

In der Literatur wurden bereits Mäuse beschrieben, in denen die Signalübertragung durch das SNS teilweise blockiert wurde. Takeda et al. verwendeten Dopamin β -Hydroxylase (Dbh)-defiziente Mäuse für ihre Studien, in welchen die Synthese der Katecholamine blockiert ist. Dbh-defiziente Mäuse zeichnen sich durch eine erhöhte Knochendichte (*high bone mass phenotype/HBM*) aus, was darauf hindeutet, dass die Signalübertragung via Katecholamine die Knochenbildung beeinflusst (Takeda et al. 2002). Unter Verwendung von β 2-Adrenozeptor-defizienten Mäusen, die sich ebenfalls durch einen HBM Phänotyp auszeichnen, konnte gezeigt werden, dass ein Mechanismus, über den

Diskussion

das SNS die Knochenmasse reguliert, vom CNS ausgehend über das Proteohormon Leptin vermittelt wird und sowohl den Knochenaufbau wie auch die –resorption beeinflusst (Elefteriou et al. 2005). Ausgehend von diesen Beobachtungen vermuteten wir einen vergleichbaren HBM-Phänotyp in den SyX-Mäusen. Die Ergebnisse der μ Ct Analysen waren jedoch kontrovers, die Mikroarchitektur des Knochengewebes der SyX-Mäuse zeichnete sich durch stark verringerte Trabekelanzahl, Trabekeldicke, Konnektivität und Knochenmasse sowie einem stark erhöhten Trabekelabstand aus. Auch in den frakturierten Femora wurden in einem Bereich, der proximal zur Fraktur lag, ähnliche Ergebnisse ermittelt. Die Trabekelanzahl, die Konnektivität und die Knochenmasse waren deutlich reduziert. Die Daten aus den biomechanischen Tests bestätigten die Ergebnisse der μ Ct Analysen, die chemische Inhibierung des SNS resultierte 21 Tage nach Fraktur in reduzierter Widerstandskraft gegen das Drehmoment, erhöhtem Torsionswinkel und reduzierter Steifigkeit des kontralateralen, nicht-frakturierten Knochens. Daten aus einer Studie von Sandhu et al. bekräftigen die durch Sympathektomie hervorgerufene Reduktion der Knochenbildung und benannten als Ursache die Zunahme der Knochenresorptionsrate. Die Rate der Mineralisierung war nach Sympathektomie reduziert, die Anzahl aktiver Osteoklasten und die Resorptionsfläche auf der Knochenmatrix waren erhöht (Sandhu et al. 1987). Wir vermuteten, dass die Knochenresorption durch die, durch eine chemische Sympathektomie erheblich verminderte, aber nicht vollständig inhibierte Synthese sympathischer Neurotransmitter aktiviert wird. Bestätigung für diese Annahme lieferten die Bestimmung der Anzahl an Osteoklasten und Osteoblasten im Gewebe der Frakturkalli. Wir konnten eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten in den Frakturkalli von SyX-Mäuse feststellen, die Anzahl der Osteoblasten zeigte keine Veränderungen im Vergleich zu den WT-Kontrollen und den Tac1-/- Mäusen. Osteoklasten aus SyX-Mäusen, die *in vitro* aus BMMs differenziert wurden, schienen aktiver zu sein, möglicherweise auf Grund ihrer reduzierten Apoptoserate, die im Vergleich zu den Tac1-/- Mäusen festgestellt wurde. In Osteoblasten aus SyX-Mäusen konnten wir eine erhöhte ALP Aktivität im Vergleich zu den Tac1-/- Mäusen feststellen, durch den Anstieg der Osteoblasten Aktivität könnten durch die ebenso erhöhte Expression von RANKL zusätzlich Osteoklasten aktiviert werden. Durch die chemische Sympathektomie werden selektiv katecholaminerge Nervenfasern zerstört und die Konzentration von NA und Adrenalin wird um 80 % reduziert. NA kann dadurch nur noch in geringen Konzentration wirken. Da NA eine höhere Affinität für α -AR im Vergleich zu β -AR besitzt, agiert NA in geringen Konzentrationen vornehmlich über α -AR (Harle et al. 2005, Straub et al. 2006). Über den α -AR-basierten Signalweg ist das SNS via NA in der Lage die Knochenbildung über Osteoblasten und die Knochenresorption über Osteoklasten zeitgleich zu modulieren, beide Zelltypen exprimieren verschiedene α -AR-Subtypen. Auf Osteoblasten konnten α 1B-, α 1D-, α 2A- und α 2C-AR gefunden werden (Fonseca et al. 2011, Huang et al. 2009a, Nishiura and Abe 2007) die

Rezeptor-Subtypen $\alpha 1A$ und $\alpha 2B$ konnten auf Osteoklasten nachgewiesen werden (Suga et al. 2010a). Nishiura und Abe konnten zudem zeigen, dass die Aktivierung der $\alpha 1$ -AR die Expression von RANKL in Osteoblasten erhöht. RANKL ist einer der potentesten Osteoklastogenese stimulierenden Faktoren (Nishiura and Abe 2007). Fonseca et al. untersuchten in ihren Studien den Einfluss des SNS auf die Osteopenie (Minderung der Knochendichte) mittels $\alpha 2A$ -/ $\alpha 2C$ -AR-defizienten Mäusen. Die Adrenozeptoren $\alpha 2A$ und $\alpha 2C$ sind prä-synaptische Rezeptoren, welche die Freisetzung von Katecholaminen inhibieren. Durch Deletion der beiden Rezeptoren wird die Katecholamin-Freisetzung nicht mehr inhibiert und führt zu einem gesteigerten sympathischen Tonus durch erhöhte NA Konzentration im Plasma. Sie erwarteten daher reduzierte strukturelle Parameter in den Knochen der Mäuse, da die hohe Konzentration an NA in der Peripherie über den β -AR-basierten Signalweg die Knochenresorption steigern würde. Stattdessen ermittelten sie einen HBM Phänotyp in den $\alpha 2A$ / $\alpha 2C$ -defizienten Mäusen (Fonseca et al. 2011). Das SNS ist demnach in der Lage, die Knochenmasse nicht nur über den β -AR-basierten sondern auch über den α -AR-basierten Signalweg zu modulieren. Der Verlust der α -AR-basierten Signalübertragung führte in den $\alpha 2A$ -/ $\alpha 2C$ -AR-defizienten Mäusen zu einem HBM Phänotyp, in SyX-Mäusen, in denen auf Grund der geringen NA Konzentrationen vornehmlich α -AR aktiviert werden, konnten wir hingegen eine minderqualitative Knochenstruktur feststellen. Daher vermuten wir folgenden Mechanismus: Durch die selektive Zerstörung der katecholaminergen sympathischen Nervenfasern mittels chemischer Sympathektomie wird die NA-Dosis im Gewebe drastisch verringert, in dieser Konzentration stimuliert NA die Osteoklastogenese über eine hochaffine Bindung an die α -AR. Zusätzlich fördert NA die Osteoklastogenese indem es an α -AR auf Osteoblasten bindet und die Expression von RANKL induziert, welches die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten induziert (Abb. 43).

Ein weiterer Mechanismus, der zur minderqualitativen Knochenstruktur nach Sympathektomie führen könnte, wurde anhand der Daten von Sherman und Chole erstellt. Die chemische Sympathektomie mit 6-OHDA in Gerbilen führte, ähnlich wie in dieser Arbeit, zu einer erhöhten Anzahl an Osteoklasten in der Knochenmatrix und einer größeren, von Osteoklasten besetzten Matrixfläche. Die Autoren vermuteten, dass der durch die Sympathektomie verursachte Anstieg an peripherem SP die Ursache für die Zunahme der Knochenresorption sei. Um dies zu testen, applizierten sie den Tieren vor der Sympathektomie Capsaicin um SP-enthaltende sensible Nervenfasern zu eliminieren. Die Anzahl an Osteoklasten und deren Resorptionsfläche wurden dadurch wieder auf das Kontrolllevel reduziert. Als Mechanismus vermuteten sie, dass der für das Überleben sympathischer Nervenfasern wichtige *Nerve growth factor* (NGF) vermehrt von sensiblen Nervenfasern aufgenommen wird und so zur erhöhten Freisetzung von SP in die Peripherie führt (Sherman and Chole 1995). Wir teilen diese Annahme und vermuten, dass die Aufnahme von NGF

durch sensible Nervenfasern die Balance des Neurotransmitter-Milieus hin zu einer erhöhten SP Freisetzung verschiebt und dadurch die Differenzierung der Osteoklasten und deren Resorptionsaktivität stimuliert (Abb. 43).

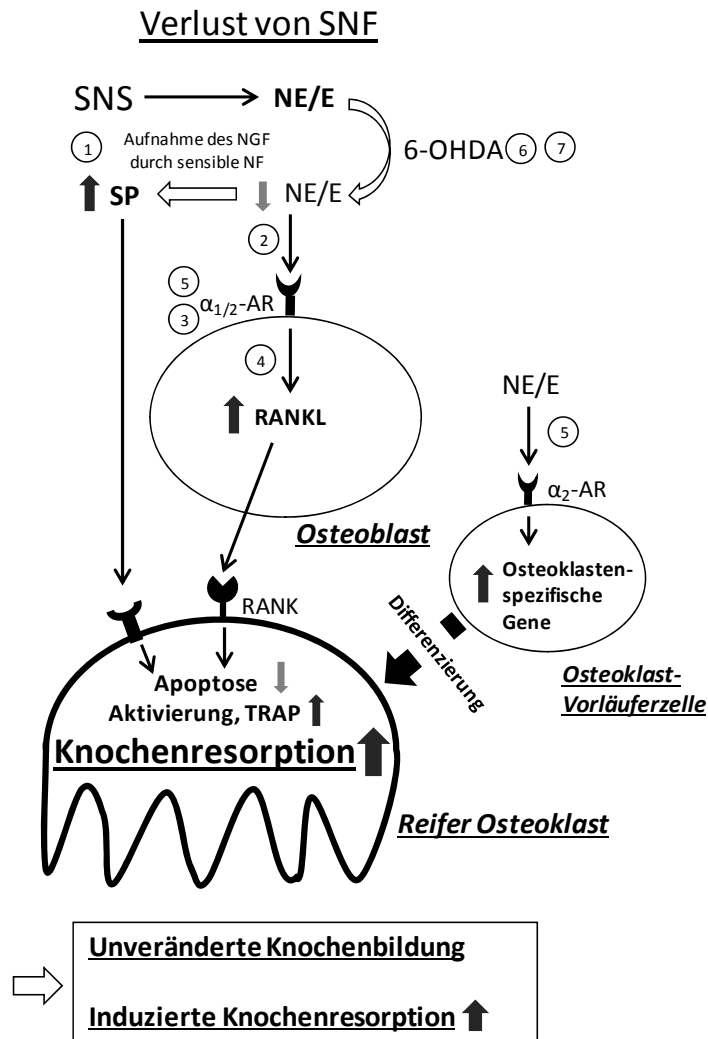


Abbildung 44: Der Verlust sympathischer Nervenfasern (SNF) durch chemische Sympathektomie mittels 6-OHDA. Katecholaminerge Nervenfasern werden selektiv zerstört und so die Neurotransmitter-Konzentration von NA und Adrenalin (A) im Gewebe drastisch reduziert. Geringe Konzentrationen von NA stimulieren die RANKL Expression in Osteoblasten via α -AR-Signalling und induzieren die Expression Osteoklasten-spezifischer Gene in Osteoklasten-Vorläuferzellen. Aufnahme des NGF über sensible Nervenfasern führt zur erhöhten Freisetzung von SP und folglich zur Aktivierung der Osteoklasten via des NK1R. Diese Mechanismen führen zum Anstieg der Osteoklastendifferenzierung und zur Aktivierung der Zellen. Das Resultat ist eine Zunahme der Knochenresorption wohingegen die Rate der Knochenbildung weitgehend unverändert bleibt, was de facto eine Netto Steigerung der Knochenresorption bedeutet. Literatur: 1) (Sherman and Chole 1995); 2) (Harle et al. 2005); 3) (Togari 2002a); 4) (Nishiura and Abe 2007); 5) (Fonseca et al. 2011); 6) (Sachs and Jonsson 1975); 7) (Rodriguez-Pallares et al. 2007)

Die Knochenresorption und die Knochenbildung sind miteinander gekoppelt, der Prozess wird als "Coupling" bezeichnet. Erhöht oder senkt sich die Aktivitätsrate von einem der Einzelprozesse, gleicht sich die Aktivität des zweiten Prozesses in der Regel an. Die Resorption des Knochens läuft jedoch schneller ab als der Aufbau des Knochens. Knochenmatrix, welche in 2-3 Wochen abgebaut wird, benötigt bis zu 3 Monate bis der Knochen vollständig erneuert wurde. Eine erhöhte Rate der Knochenresorption kann daher, auch wenn sie von einem gleichzeitigen Anstieg der Knochenbildung begleitet wird, auf Grund dieser kinetischen Unterschiede zum Verlust der Knochenmasse führen (Harada and Rodan 2003).

Wir denken, dass die Ablation des SNS im Verlauf des 4-wöchigen Experiments im Rahmen dieser Arbeit zu einer direkten Induktion der Knochenresorption führte, ohne die Rate der Knochenbildung signifikant zu erhöhen, was in einem „Netto“-Abbau der Knochenmatrix resultiert (Abb. 4.2).

Die Qualität der Knochenstruktur war nach Sympathektomie in den frakturierten Beinen nicht nur im Vergleich zu den WT-Kontrollen sondern auch im Vergleich zu den Tac1^{-/-} Mäusen reduziert. In den kontralateralen, nicht-frakturierten Beinen konnte ebenfalls eine Minderung der Knochenqualität im Vergleich zu den Tac1^{-/-} Mäusen festgestellt werden, jedoch waren die Unterschiede hier geringer. Beide Nervensysteme modulieren die Mikroarchitektur der Knochenmatrix, das SNS scheint jedoch stärkere Effekte auszuüben, besonders in Situationen, in denen der *Remodelling*-Prozess durch ein Trauma aktiviert wurde.

5.7 Vergleich der biomechanischen Eigenschaften und der strukturellen Parameter der frakturierten mit den nicht-frakturierten Beinen innerhalb und zwischen den Mausgruppen

Durch einen Vergleich der biomechanischen Eigenschaften der frakturierten Beine mit den jeweiligen kontralateralen, nicht-frakturierten Beinen sollte die Belastbarkeit des nach 21 Tagen neu gebildeten Knochens ermittelt werden. Dieser Vergleich wurde auch mit den Daten der μ Ct Analysen durchgeführt. Die biomechanischen Eigenschaften der frakturierten Beine von SyX^{-/-}, Tac1^{-/-} Mäusen und WT-Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant von den Eigenschaften der jeweiligen nicht-frakturierten Beine. Die mechanische Stabilität des neu gebildeten Knochens ist daher mit der mechanischen Stabilität des bestehenden "alten" Knochengewebes vergleichbar. Der Vergleich der strukturellen Knochenparameter aus den μ Ct Analysen ergab signifikante Änderungen in dem proximal zur Fraktur gelegenen VOI der frakturierten Beine im Vergleich zu dem entsprechenden VOI im kontralateralen, nicht-frakturierten Beinen der WT-Kontrolltiere. In der Knochenstruktur proximal zur Fraktur gelegen, konnten wir eine geringere Trabekelanzahl, -dicke, Konnektivität und Knochenmasse und einen erhöhten Trabekelabstand im Vergleich zum kontralateralen

Femurknochen feststellen. Wir konnten diese Veränderungen nicht in den Knochen der SyX- und Tac1^{-/-} Mäuse feststellen. Wir vermuten, dass SyX- und Tac1^{-/-} Mäuse auf Grund des geringeren Berührungsempfindens weniger Schmerzen in den frakturierten Beinen fühlen und daher die frakturierten Beine bereits kurze Zeit nach dem Setzen der Fraktur belasten. WT-Kontrolltiere hingegen werden die frakturierten Beine erst zu einem späteren Zeitpunkt wieder vollständig belasten. Wir vermuten, dass die länger andauernde Entlastung der Beine in den WT-Kontrollen die strukturelle Knochenqualität proximal zur Fraktur vermindert hat. Die Entlastung von Skelettelementen führt zu einer Reduktion der Knochenbildung, Mineralisierung und Osteoblastenzahl (Bikle and Halloran 1999). Die Reduktion mechanischer Stimuli führt zu einer erhöhten Apoptoserate in Osteozyten und wird teilweise von der Rekrutierung reifer Osteoklasten begleitet (Aguirre et al. 2006). Interessanterweise war die Mikroarchitektur des Knochens proximal zur Fraktur gelegen in den WT-Kontrolltieren und den SyX-Mäusen deutlich schlechter im Vergleich zu den Tac1^{-/-} Mäusen. Tac1^{-/-} Mäuse zeigten schon während der Entzündungsphase ein verringertes Schmerzempfinden. Daher glauben wir, dass sie das frakturierte Bein im Gegensatz zu den anderen Gruppen bereits während der Entzündungsreaktion stärker belasteten und damit den Regenerationsprozess beschleunigten. WT-Kontrolltiere und SyX-Mäuse hingegen haben die frakturierten Beine deutlich länger entlastet.

5.8 Die Deletion des Tachykinin-1 Gens und die SyX beeinflussen die Genexpression in Kallus-Explantatkulturen

Die Genexpression der *mmp-2*, *-3* und *-14* war im Vergleich zu den WT-Kontrollen in den Explantatkulturen der SyX-Mäuse nach Zugabe von IL-1 β (Simulation der Entzündungsphase) 8 Tage nach Fraktur reduziert. Ohne IL-1 β war die Genexpression der *mmps* in Explantatkulturen jedoch erhöht. Ähnliche Ergebnisse konnten in den Explantatkulturen der Tac1^{-/-} Mäuse detektiert werden, keine Regulation konnte jedoch für *mmp-2* in Abwesenheit von IL-1 β und *mmp-14* nach Zugabe von IL-1 β in den Explantatkulturen der Tac1^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen festgestellt werden. Die Genexpression von TIMP-1, -2 und -3 gleicht dem Expressionsmuster der MMPs. Ries et al. zeigten, dass Timp-2, MMP-2 und -14 von hMSCs konstitutiv exprimiert werden und bei der Migration durch Basalmembranen eine wichtige Rolle spielen (Ries et al. 2007). Vor allem MMP-14 scheint bei der Migration von Zellen wie MSCs oder Monozyten wichtig zu sein (Son et al. 2006, Annabi et al. 2003, Matias-Roman et al. 2005). MMP-14 ist zudem maßgeblich an dem Prozess der enchondralen Ossifikation beteiligt. Die Deletion von MMP-14 führt zu schweren Störungen der enchondralen Ossifikation im Verlauf der embryonalen Skelettentwicklung (Holmbeck et al. 1999, Zhou et al. 2000). Wir konnten in SyX-Mäusen in der frühen Phase der Frakturheilung eine

Verzögerung der Kallusreifung im Vergleich zu den WT-Kontrollen feststellen. Möglicherweise könnten Unterschiede im Expressionsmuster von *timp-2*, *mmp-2* und *-14*, die wir in Explantatkulturen der SyX-Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen feststellen konnten, durch Änderungen des Migrationsverhalten der mesenchymalen Zellen auch *in vivo* eine Rolle gespielt haben.

Das Zytokin IL-6 ist ein wichtiger Entzündungsmediator, seine Expression wird in Gegenwart von IL-1 β induziert, erreicht binnen der ersten 24 Stunden nach Fraktur das Maximum und fällt danach wieder auf das basale Expressionsniveau ab (Cho et al. 2002, Sfeir et al. 2005). Während des *Remodellings* der knorpeligen Matrix ist die Expression von IL-6 nicht mehr detektierbar (Gerstenfeld et al. 2003). In unseren Analysen war die Expression von IL-6 in den Kallusexplantaten der SyX-Mäuse in Gegenwart von IL-1 β im Vergleich zu den WT-Kontrollen reduziert. In Abwesenheit von IL-1 β war die Expression von IL-6 in den Kallus-Explantaten der SyX-Mäuse jedoch erhöht. Ein ähnliches Expressionsmuster wie für IL-6 konnte in den Explantatkulturen der SyX-Mäuse für MIP-2 und iNos detektiert werden. Die Produkte beider Gene sind ebenfalls potentielle Entzündungsmediatoren. Änderungen im Expressionsmuster dieser Entzündungsmediatoren könnten auch *in vivo* zu einer inadäquaten Entzündungsreaktion während der frühen Heilungsphase und möglicherweise zu einer Verzögerung der Kallusreifung in den SyX-Mäusen beigetragen haben

In den Kallusexplantaten der Tac1 $^{-/-}$ Mäuse war die Expression von iNos sowohl in Gegenwart von IL-1 β als auch ohne IL-1 β reduziert. Die Expression der iNos ist maximal während der initialen Phase der Frakturheilung und produziert große Mengen an NO (Zhu et al. 2001). Eine Inhibierung der iNos führte im Frakturmodell in der Ratte zu einem verringerten Kallusdurchmesser und reduzierten biomechanischen Eigenschaften der frakturierten Beine (Diwan et al. 2000). Diese Beobachtungen sind den Ergebnissen der Tac1 $^{-/-}$ Mäuse ähnlich. Zudem wurde bereits beschrieben, dass SP die Produktion von NO induziert, was die Neovaskularisierung von Gewebe und die Proliferation von Endothelzellen beeinflusst (Ziche et al. 1994). Der fehlende Einfluss von SP auf die NO-Produktion via iNos könnte bei der Produktion der Kallusmatrix in den Tac1 $^{-/-}$ Mäusen eine Rolle gespielt haben, da wir eine Reduktion des Kallus-Volumens im Vergleich zu den WT-Kontrollen und den SyX-Mäusen feststellen konnten.

Entgegen dem Expressionsmuster der restlichen Entzündungsmediatoren war die Expression von *cox-2* in den Explantatkulturen der SyX- und Tac1 $^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den WT-Kontrollen sowohl mit als auch ohne IL-1 β signifikant erhöht. Cox-2 wird durch Entzündungsreaktionen aktiviert und führt zur Bildung von Prostaglandinen. Lau et al. untersuchten den Einfluss einer Cox-2-Gentherapie im Verlauf der Tibia-Frakturheilung im Mausmodell und beschrieben eine erhöhte MSC-Rekrutierung sowie eine geringere Knorpelproduktion und ein schnelleres Überbrücken des

Diskussion

Frakturspalts (Lau et al. 2013). In SyX-Mäusen könnten Änderungen in der Cox-2 Expression die Rekrutierung mesenchymaler Zellen und die Bildung des mesenchymalen Kallus während der frühen Phase moduliert haben. In Tac1^{-/-} Mäusen konnten wir ein geringeres Kallusvolumen feststellen verglichen mit den WT-Kontrollen, was auf eine allgemein geringere Matrixbildung hindeutet. Veränderungen in der Cox-2 Expression könnten an diesem Effekt beteiligt sein.

Einige Kallus-Explantatkulturen von Tac1^{-/-} Mäusen und WT-Kontrollen wurden mit SP stimuliert, um zu testen, ob die Veränderungen im Genexpressionsmuster reversibel bzw. SP-vermittelt sind. Die Genexpression Matrix-modulierender Faktoren (*timps*, *mmps*) war in unstimulierten Explantatkulturen von Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen signifikant erhöht und konnte für *timp-1*, *-3*, *mmp-3* und *-14* durch Stimulation mit SP (10^{-10} M) rückgängig gemacht werden. Die Stimulation der Kallus-Explantate von WT-Kontrolltieren mit SP zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zu den unstimulierten WT-Kontrollen. In Gegenwart von IL-1 β war die Genexpression der *timps* und *mmps* in den unstimulierten Explantatkulturen der Tac1^{-/-} Mäuse signifikant reduziert im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen, diese Effekte waren durch Stimulation mit SP reversibel. Die Stimulation von Explantaten aus WT-Kontrolltieren mit SP (10^{-8} M) steigerte die Expression von *timp-1*, *-2*, *-3* und *mmp-2* im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen. Die Genexpression Matrix-modulierender TIMPs und MMPs wird durch den SP-vermittelten Signalweg beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass das sensible Nervensystem durch den Neurotransmitter SP sowohl katabolische, wie auch anabolische Effekte auf das Matrix-Remodelling ausüben kann. Die *in vitro* Genexpression der Entzündungsmediatoren *IL-6*, *cox-2* und *iNos* wird ebenso durch den SP-basierten Signalweg moduliert. Die Stimulation der Explantatkulturen von WT-Kontrollen mit SP zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Genexpression von *IL-6*, *cox-2* und *iNos* im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen. Die signifikanten Änderungen im Genexpressionsmuster der Explantate aus Tac1^{-/-} Mäusen konnten jedoch durch Stimulation mit SP Dosis-abhängig wieder an das Expressionsniveau der unstimulierten WT-Kontrollen angenähert werden. Die signifikante Änderung der Genexpression von *MIP-2* in den unstimulierten Explantatkulturen von Tac1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den unstimulierten WT-Kontrollen konnte nicht durch zusätzliche Stimulation mit SP rückgängig gemacht werden. Ebenso zeigte die Stimulation der Kallus-Explantate der WT-Kontrollen keine Änderungen in der Expression von *MIP-2*. Die Genexpression von *MIP-2* scheint nicht direkt durch SP beeinflusst zu werden.

Das Fehlen von SP und die chemische Ablation des SNS scheinen die Expression der untersuchten Gene in ähnlicher Richtung zu modulieren. Die Effekte der chemischen Sympathektomie scheinen jedoch deutlich stärker zu sein. Das sympathische Nervensystem vermittelt seine Effekte über eine Vielzahl an Neurotransmittern wie Neuropeptid Y (NPY), vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und

Katecholamine wie Noradrenalin (Elefteriou et al. 2014, Grassel 2014). Eine Sympathektomie hat daher vermutlich weitreichendere Effekte als die Deletion des Tachykinin1 Gens. Die Deletion des Tachykinin1 Gens führt zum Verlust von SP, nicht jedoch zum Verlust eines kürzlich beschriebenen Tachykinins, das Hemokinin-1. In vitro Studien mit humanen Monozyten sowie in vivo Studien mit Gerbilen und Mäusen zeigten, dass Hemokinin-1 ein selektiver NK1R-Agonist ist und ähnliche Effekte vermitteln kann wie SP (Cunin et al. 2011, Duffy et al. 2003, Zhang et al. 2000). Die Effekte, die durch das Fehlen von SP verursacht werden, könnten daher in Tac1^{-/-} Mäusen durch Hemokinin-1 zumindest teilweise kompensiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl SP als auch das sympathische Nervensystem bedeutende neuronale Mediatoren im Knochenmetabolismus und während des Reparaturprozesses nach einem Trauma sind. Sie beeinflussen das Schmerzempfinden nach einer Fraktur und sind in der Lage, die Kallusdifferenzierung nach einem Frakturtrauma zu modulieren. Wir konnten zeigen, dass Chondrozyten im Frakturkallus den NK1R exprimieren und durch endogene Produktion von SP autokrine und parakrine Effekte ausüben können. Mesenchymale Zellen und Chondrozyten im Frakturkallus exprimieren die Adrenozeptoren $\alpha 1D$ und $\alpha 2B$, nicht aber den $\beta 2$ -Adrenozeptor, was auf eine α -Adrenozeptor-basierte Interaktion zwischen den neuronalen Mediatoren der sympathischen Nervenfasern und der Zellen im Frakturkallus schließen lässt. Die Ablation des SNS verzögert die Kallusreifung bereits zu einem frühen Zeitpunkt, wohingegen das Fehlen von SP zu dem Zeitpunkt keinen Effekt zeigt. In der späten Phase der Kallusreifung verzögert das Fehlen von SP und auch eine deutlich reduzierte NA-Konzentration (in den SyX-Mäusen) die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten im Frakturkallus. Wir nehmen an, dass SP und hohe NA-Konzentrationen die terminale Differenzierung von Chondrozyten in der späten Heilungsphase fördern. Die Genexpressionsanalysen lassen vermuten, dass sympathische Neurotransmitter vermehrt die Rekrutierung und Differenzierung der Zellen beeinflusst, SP dagegen vermehrt Faktoren moduliert, die den Auf- und Abbau der ECM steuern. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen müssen jedoch durch weitere Experimente wie Western Blot Analysen oder Enzyme-linked Immunosorbent Assays ergänzt werden, bevor die aus den vorläufigen Daten geschlossenen Vermutungen bestätigt und eine definitive Aussage gemacht werden kann. Das SP-positive Nervensystem und das SNS regulieren auch die Entwicklung des Skeletts während des Wachstums. Unsere Daten zeigen eine Verschlechterung der Mikroarchitektur und der mechanischen Eigenschaften des frakturierten Knochens proximal vom Kallus. Die strukturellen Knochenparameter und die mechanische Stabilität sind jedoch in den nicht-frakturierten Beinen sogar stärker beeinträchtigt als in den frakturierten Beinen. Wir vermuten, dass das SNS die Knochenstruktur eher

Diskussion

über die Regulierung der Knochenresorption beeinflusst während ein adäquates SP-Neurotransmitter-Milieu vor allem für die Knochenbildung während der Entwicklung des Skeletts nötig zu sein scheint.

Zusammenfassung

Nervenfasern des peripheren sensiblen und sympathischen Nervensystems innervieren den Knochen, das Knochenmark und das Periost. Via Neurotransmitter, die von den peripheren Nervenfasern abgegeben werden, moduliert das Nervensystem die enchondrale Ossifikation während des Knochenlängenwachstums und während der Kallusdifferenzierung nach einem Frakturtrauma im adulten Organismus. Die Effekte dieser neuronalen Mediatoren auf den Vorgang der enchondralen Ossifikation während der Embryogenese und nach Frakturtrauma im adulten Organismus sind noch weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der sensible Neurotransmitter SP und das sympathische Nervensystem unter physiologischen Knochenumbauprozessen und pathophysiologischen Bedingungen der Kallusreifung nach Fraktur – verwendet als adultes Modell der enchondralen Ossifikation – entscheidende trophische Effekte ausüben.

Durch die Expression des NK1R und die endogene Produktion von SP sind Chondrozyten im Frakturkallus in der Lage autokrin und parakrin zu agieren. Zusätzlich waren TH-immunoreaktive Nervenfasern während des gesamten Heilungsverlaufs im Periost detektierbar. Wir konnten zeigen, dass Zellen im Frakturkallus $\alpha 1D$ - und $\alpha 2B$ -AR exprimieren und dadurch in der Lage sind auf sympathische Stimuli zu reagieren. 5 Tage nach Fraktur führte das Fehlen von SP zu einer Reduktion der Berührungssensibilität, die Ablation des SNS (Syx) verringerte 8 Tage nach Fraktur die Berührungssensibilität. Die Analysen der Gewebezusammensetzung im Frakturkallus zeigten, dass SyX-Mäuse 5 Tage nach Fraktur einen größeren Anteil an mesenchyalem Kallusgewebe und einen geringeren Anteil an knorpeligem Softkallus aufwiesen, was auf eine Verzögerung des Heilungsprozesses hindeutet. 13 Tage nach Fraktur verzögerte das Fehlen von SP und die SyX die terminale Differenzierung der Chondrozyten, die Fläche mit hypertrophen Chondrozyten im knorpeligen Softkallus von SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen war signifikant geringer. Die geringere Anzahl an Osteoblasten und Osteoklasten in den Frakturkalli von Tac1^{-/-} Mäusen lässt vermuten, dass das Fehlen von SP die Differenzierung osteogener Zellen verzögert. Das Fehlen von SNF während der Frakturheilung scheint hingegen die Osteoklastogenese zu aktivieren, worauf die erhöhte Anzahl an Osteoklasten in Frakturkalli sympathektomierter Mäuse hindeutete. Das Fehlen von SP und die Ablation des SNS resultierten 21 Tage nach Fraktur in signifikant verminderten strukturellen Knochenparametern der frakturierten und nicht-frakturierten Femora, wobei die fehlenden sympathischen Effekte eine drastischere Wirkung erzielten. Die biomechanischen Tests bestätigten die beeinträchtigten mechanischen Eigenschaften der frakturierten und nicht-frakturierten Femora von SyX- und Tac1^{-/-} Mäusen. Die *in vitro* Analysen von isolierten Osteoblasten aus Tac1^{-/-} Mäusen zeigten, dass diese eine geringere ALP-Aktivität aufwiesen, isolierte Osteoklasten zeigten eine höhere

Zusammenfassung

Apoptoserate. Isolierte Osteoblasten aus SyX-Mäusen zeigten *in vitro* eine erhöhte ALP-Aktivität, Osteoklasten aus sympathektomierten Mäusen zeigten eine reduzierte Apoptoserate und einer erhöhte Kathepsin K Aktivität. Das Fehlen von SP und die chemische Sympathektomie beeinflussen die Expression selektiver Gene, die am Matrix-Umbau und an der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Unserer Daten und die aus vorhandener Literatur zeigen, dass das Fehlen von SP die Anzahl und die Resorptionsaktivität von Osteoklasten über den NK1R-vermittelten Signalweg reduziert und so zu einer verringerten Knochenresorptionsrate führt. Gleichzeitig reduziert das Fehlen von SP deutlich die Proliferation und die Aktivität von Osteoblasten, was – trotz verringerter Knochenresorption – zu einer Netto-Reduktion der Knochenbildung führt (Abb. A -1). Die chemische Sympathektomie führt zur selektiven Zerstörung katecholaminerger Nervenfasern, was zu einer geringen NA und Adrenalin Konzentration im Gewebe führt. Da NA in geringen Konzentrationen vornehmlich α -AR stimuliert, vermuten wir, dass NA die α -AR auf den Osteoblasten aktiviert und zu vermehrter Produktion des Osteoklastogenese-fördernden Faktors RANKL führt. Die Aktivierung der α -AR auf Osteoklasten-Vorläuferzellen führt zusätzlich zur vermehrten Produktion von Osteoklastogenese-fördernden Genen. Zudem nehmen sensible Nervenfasern den Wachstumsfaktor NGF auf, was die SP Produktion und die Stimulation der sensiblen Nervenfasern erhöht, woraufhin SP vermehrt in die Peripherie abgegeben werden könnte und die Osteoklastogenese durch Bindung an den NK1R auf den Osteoklasten stimuliert. Diese Mechanismen führen zu einer Induktion der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung und einem Netto-Anstieg der Knochenresorption wohingegen die Rate der Knochenbildung unverändert bleibt (Abb. A-2).

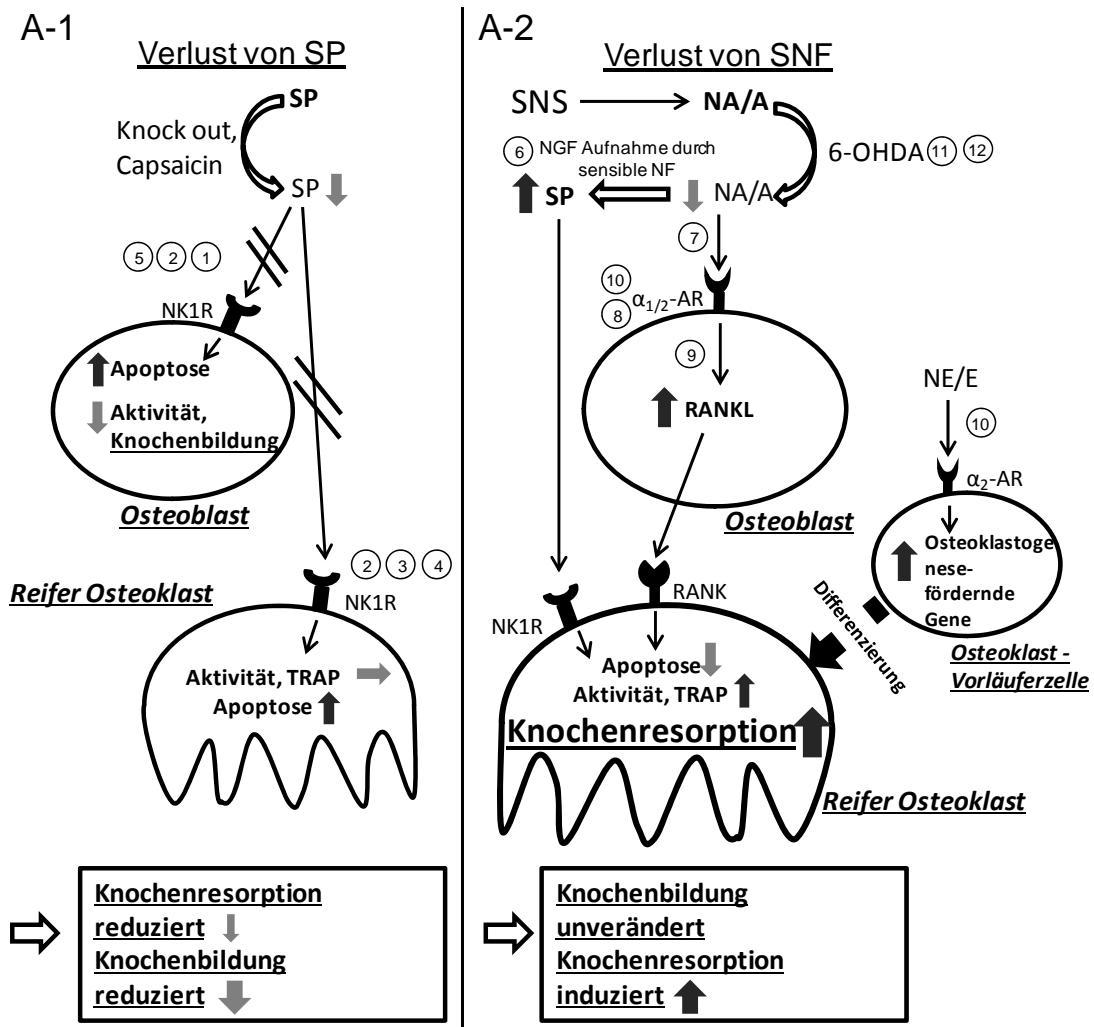


Abbildung A: Zusammenfassung der Mechanismen, welche zu den Veränderungen der strukturellen und mechanischen Knochenparameter führen. A-1) Der Verlust von SP: Das Fehlen des SP-vermittelten Signalwegs reduziert die Anzahl und die Resorptionsaktivität der Osteoklasten via des NK1R und führt dadurch zu einer Reduktion der Knochenresorptionsrate. Zudem reduziert das Fehlen von SP die Osteoblastenproliferation und -aktivität und resultiert dadurch – **trotz Verringerung der Resorption** – in einer Netto-Reduktion der Knochenbildungsrate. **A-2) Der Verlust sympathischer Nervenfasern (SNF):** Die chemische Sympathektomie durch 6-OHDA zerstört selektiv katecholaminerge Nervenfasern und reduziert die Konzentration der Neurotransmitter Noradrenalin (NA) und Adrenalin (A) um ein Vielfaches. Geringe NA Konzentrationen stimulieren α-AR auf Osteoblasten, was u.a. zu einem Anstieg der RANKL Expression führt, und auf Osteoklasten-Vorläuferzellen, was zur Aktivierung der Expression Osteoklasten-spezifischer Gene führt. Sensible Nervenfasern nehmen den Wachstumsfaktor *Nerve growth factor* (NGF) auf, was zu einer erhöhten Ausschüttung von SP führt. Dadurch werden Osteoklasten über den NK1R-basierten Signalweg aktiviert. Diese Mechanismen führen zu einem Anstieg der Osteoklastendifferenzierung und -aktivität und zu einem Netto-Anstieg der Knochenresorption wohingegen die Knochenbildungsrate unverändert bleibt. Literatur: 1) Adamus et al., 2001; 2) Wang et al., 2009; 3) Hill et al., 1991; 4) Kojimata et al., 2006; 5) Goto et al., 2007; 6) Sherman and Chole, 1995; 7) Härle et al., 2005; 8) Togari et al., 2002; 9) Nishiura and Abe, 2007; 10) Fonseca et al., 2011; 11) Sachs and Jonsson, 1975; 12) Rodriguez-Pallares et al., 2007.

Summary

Nerve fibers of the peripheral sensory and sympathetic nervous system innervate bone, bone marrow and periosteum. Via neurotransmitters – released by peripheral nerve fibers – the nervous system modulates endochondral ossification during bone growth and during callus differentiation after fracture in an adult organism. The effects of these neuronal signals on endochondral ossification during embryogenesis and after fracture in an adult organism are largely unknown. This study shows that the sensory neurotransmitter SP and the sympathetic nervous system have crucial trophic effects under physiological bone resorbing processes and pathophysiological situations of callus maturation after fracture – used as an adult model for endochondral ossification.

Chondrocytes in the fracture callus can exert autocrine and paracrine effects as they express the NK1R and produce endogenously SP. We detected TH-immunoreactive nerve fibers in the periosteum throughout the healing process. We demonstrated that cells in the fracture callus express α 1D- and α 2B-AR and hence could respond to sympathetic stimuli. Touch sensitivity was reduced 5 days after fracture in the absence of SP, ablation of the SNS (SyX) reduced touch sensitivity 8 days after fracture. Analysis of callus tissue composition revealed that SyX-mice developed more mesenchymal callus tissue and less cartilaginous softcallus tissue 5 days after fracture indicating a delay in the healing process. Absence of SP and SNS delayed terminal chondrocyte differentiation 13 days after fracture as the area covered by hypertrophic chondrocytes was significantly reduced in cartilaginous callus of SyX- and Tac1^{-/-} mice. We detected a lower number of osteoclasts and osteoblasts in the fracture calli of Tac1^{-/-} mice indicating that osteogenic differentiation is delayed when SP-signaling is missing. Absence of SNF during fracture healing seems to induce osteoclastogenesis as we found a higher number of osteoclasts in fracture calli of SyX-mice. 21 days after fracture absence of SP and the ablation of the SNS results in significantly impaired structural bone parameters in contralateral and fractured legs, whereby loss of sympathetic nervous system resulted in an even more severe effect. Mechanical testing confirmed the overall reduced bone structural quality in the fractured and contralateral legs of SyX- and Tac1^{-/-} mice. *In vitro* analysis of primary osteoblasts isolated from Tac1^{-/-} mice showed reduced ALP activity and apoptosis rate was higher in primary osteoclasts isolated from Tac1^{-/-} mice. Primary osteoblasts isolated from SyX-mice revealed a higher ALP activity *in vitro*, osteoclasts from SyX-mice revealed a reduced apoptosis rate and a higher cathepsin K activity. Absence of SP and SNS modulates expression of selective genes that are involved in matrix remodeling and inflammation. Our data and data from literature confirm that absence of SP signaling reduces number and resorption activity of osteoclasts via NK1R thereby

leading to a reduced bone resorption rate. It further reduces proliferation and activity of osteoblasts resulting in a net decrease in bone formation rate despite reduced resorption rate (Fig. A-1). Chemical sympathectomy selectively destroys catecholamiergic nerve fibers resulting in very low concentrations of norepinephrine (NE) and epinephrine (E) in tissues. As low concentrations of NE are acting preferentially via α -AR we propose that NE activates α -AR on osteoblasts increasing production of RANKL, a potent osteoclastogenesis-stimulating factor. Activation of α -AR on osteoclast progenitor cells additionally results in upregulation of osteoclastogenesis-related genes. Moreover, the uptake of NGF by sensory nerve fibers increases SP production and stimulation of sensory nerve fibers and hence could increase SP release from peripheral nerve endings and that way stimulate osteoclastogenesis via binding to the NK1R located on osteoclasts. These mechanisms lead to an induction of osteoclast differentiation and activation and a net increase of bone resorption while bone formation rate remains unaffected.

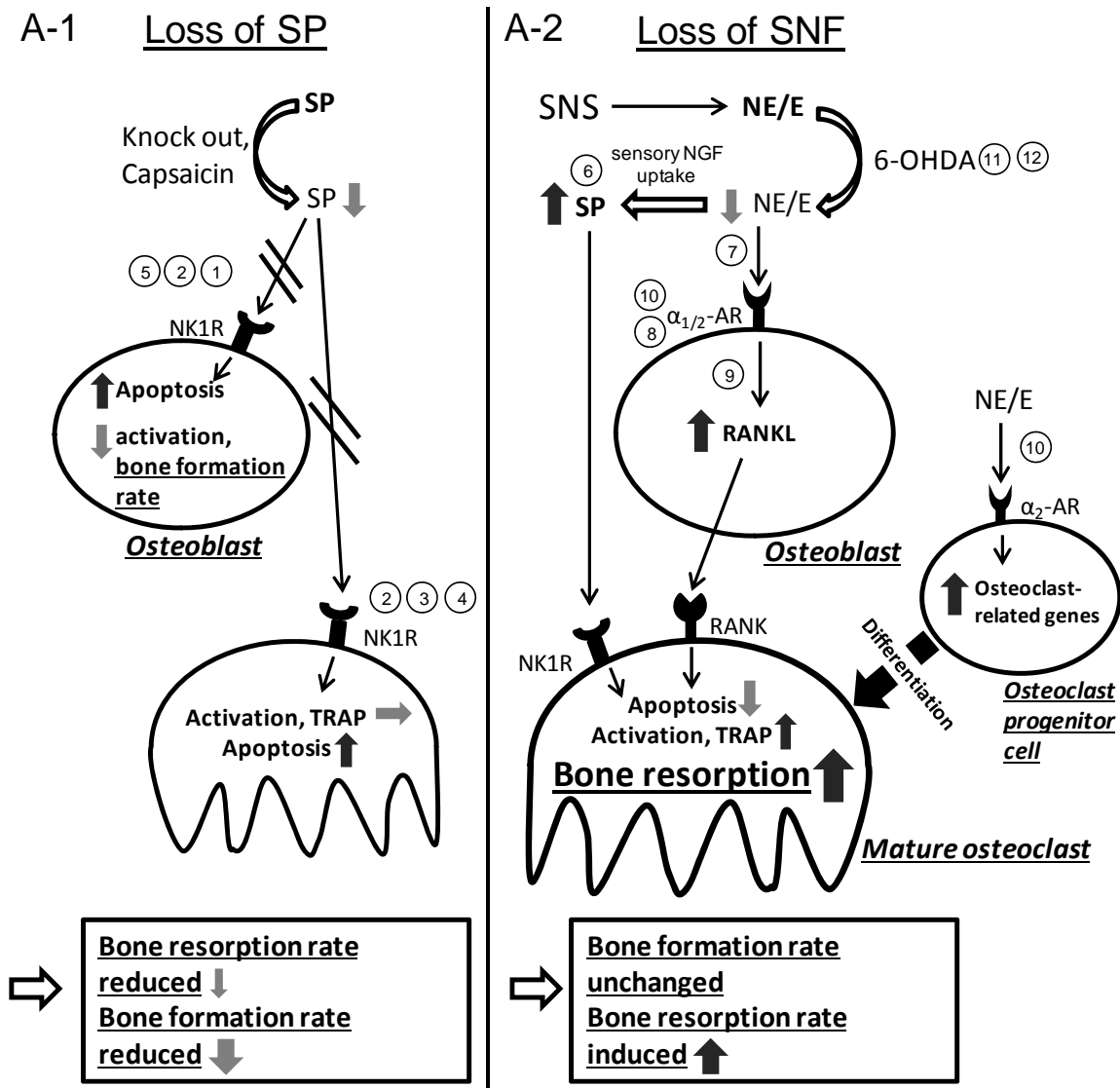


Figure A: Summary of the mechanisms leading to changes in the structural and mechanical bone parameters. A-1) Absence of SP: Absence of SP signaling reduces number and resorption activity of osteoclasts via the NK1R thereby leading to a reduced bone resorption rate. It further reduces osteoblast proliferation and activity resulting in a net decrease in bone formation rate despite reduced resorption rate. A-2) Absence of sympathetic nerve fibers (SNF): 6-OHDA treatment selectively destroys catecholaminergic (CA) nerve fibers and strongly reduces neurotransmitter concentration of norepinephrine (NE) and epinephrine (E). Low concentrations of NE are acting via α -adrenergic receptors on osteoblasts increasing RANKL expression, and on osteoclast progenitor cells resulting in upregulation of osteoclastogenesis-related genes. Uptake of nerve growth factor (NGF) by sensory nerve fibers leads to increased SP release. Thus osteoclasts are activated by signaltransduction via the NK1R. These mechanisms lead to increased osteoclast differentiation and activation and a net increase in bone resorption while bone formation presumably remains unchanged. Literature: 1) Adamus et al., 2001; 2) Wang et al., 2009; 3) Hill et al., 1991; 4) Kojimata et al., 2006; 5) Goto et al., 2007; 6) Sherman and Chole, 1995; 7) Härle et al., 2005; 8) Togari et al., 2002; 9) Nishiura and Abe, 2007; 10) Fonseca et al., 2011; 11) Sachs and Jonsson, 1975; 12) Rodriguez-Pallares et al., 2007

Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei den Menschen bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Susanne Grässel (Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Experimentelle Orthopädie, Universitätsklinikum Regensburg) für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung bei der Bearbeitung dieses hochinteressanten Forschungsthemas. Vielen Dank für die kompetenten Anregungen und Ideen sowie die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Bedanken möchte ich mich auch für die stets offene Tür bei Fragen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Ein herzliches Dankeschön für die Möglichkeit zur Teilnahme an vielen nationalen und internationalen Konferenzen und die Freiheit, die Sie mir während des gesamten Projekts gewährte.

Für die wertvollen Anregungen und guten Ratschläge, für die engagierte und kompetente Betreuung als mein 2. Mentor und die Begutachtung dieser Arbeit möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Rainer H. Straub (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Experimentelle Rheumatologie und Neuroendokrine Immunologie, Universitätsklinikum Regensburg) bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Joachim Grifka (Klinik und Poliklinik für Orthopädie im Asklepios Zentrum Bad Abbach, Universitätsklinikum Regensburg) bedanke ich mich für die Möglichkeit, dass ich meine Dissertation an seinem Institut erstellen durfte.

Für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der stabilisierten Femurfrakturen möchte ich mich bei Herrn Dr. H.-Robert Springorum (Klinik und Poliklinik für Orthopädie im Asklepios Zentrum Bad Abbach, Universitätsklinikum Regensburg) und bei Herrn Dr. Richard Stange (Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Münster) bedanken. Herrn Dr. Volker Kuhn (Universitätsklinik für Unfallchirurgie, Medizinische Universität Innsbruck) danke ich für die Durchführung der μ Ct-Analysen. Frau Dr. Britta Wieskötter (Universitätsklinik für Unfallchirurgie, Medizinische Universität Innsbruck) danke ich für die Durchführung der biomechanischen Tests.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Richard Bauer für die vielen guten Ratschläge die mir bei der Erstellung meiner Dissertation geholfen haben.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an die Mitarbeiter der Experimentellen Orthopädie richten, die mir immer unterstützend mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Dominique Muschter und bei Anja Pasoldt für die fachliche Unterstützung, die Freundschaft und den wertvollen, unterstützenden Beistand in den letzten Jahren bedanken.

Danksagung

Ein ganz herzliches Dankeschön gebührt auch allen Mitarbeitern des ZMB im BioPark1. Liebes ZMB-Team, Danke für die schöne Zeit und die ausgesprochen angenehme Atmosphäre.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern, Edith und Josef Niedermair, meiner Familie und meiner Patentante Eleonore Schmidt, denen diese Doktorarbeit gewidmet ist, danken. Sie haben mir mit ihrer unermüdlichen und liebevollen Unterstützung diesen Weg ermöglicht. Danke für den Rückhalt und die Geduld.

Bei all meinen lieben Freunden möchte ich mich für die Ruhe, die Kraft und die Motivation bedanken mit der sie mir zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Ort, Datum

Tanja Niedermair

Lebenslauf

Curriculum vitae

Tanja Niedermair

CERTIFIED BIOLOGIST

*Orthopaedic Surgery, Experimental Orthopaedics
University of Regensburg, Germany
tanja.niedermair@klinik.uni-regensburg.de*

Education

2010 - 2015	PhD thesis
09/2009-06/2010	Diploma thesis at the Department of Radiation Oncology, LMU, Munich „DNA-Repair in Chromocenters and other chromatin regions“; Analyzing DNA damage after irradiation (with ions, X-rays, alpha irradiation)
10/2005-09/2009	Diploma in biology at the LMU Munich Major subject: Anthropology and Human genetic Minor: Cell biology; Pharmacology and Toxicology
1993-2003	Dom-Gymnasium Freising Abitur (Biology, English, Mathematics, History)

Courses

01/2011-07/2011	FELASA B Training in laboratory animal science and animal welfare
04/2013	Genetic engineering law Training for the competence as a project manager for genetic engineering and representative for biological safety (§§15 und 17 German gene technology law)
07/2013	Seminar " Good Scientific working/Scientific practice "

Scientific meetings

- DKOU 2013 - Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie; (German convention of orthopaedics and trauma surgery), Berlin, Germany; Oral presentation: Die Rolle von Substanz P und Noradrenalin in der Kallusdifferenzierung

- DGMB – Deutsche Gesellschaft für Matrixbiologie e.V. (German Society for Matrix Biology), annual meeting 2013; Tübingen, Germany; Oral presentation and poster: The role of Substance P and Norepinephrine in callus differentiation
- GEBIN - German Endocrine Brain Immune Network, 2013, Regensburg, Germany; Oral presentation: The role of substance P and noradrenaline in callus differentiation
- ORS - Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2013; San Antonio, Texas, USA; Poster presentation: The role of substance P and norepinephrine in callus differentiation; Participation in: Women´s leadership forum
- ESTROT Congress 2013, Milan, Italy; Oral presentation: The role of substance P in callus differentiation
- BSMB/DGBF 2012 „Matrix Molecular Biology: Integration of Tissue Function and Disease“; Oxford, UK; Oral presentation and poster: The role of substance P and noradrenalin in callus differentiation
- DKOU 2011 - Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie; (German convention of orthopaedics and trauma surgery), Berlin, Germany; Poster presentation: Die Rolle sensorischer Neuropeptide und Katecholamine in der Kallusdifferenzierung
- DGMB – Deutsche Gesellschaft für Matrixbiologie e.V. (German Society for Matrix Biology), annual meeting 2011; Cologne, Germany; Poster presentation: The role of sensory neuropeptides and catecholamines in callus differentiation

Stipendia

- GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG; Travel award, ORS 2013 in San Antonio, Texas, USA; Poster presentation: „The role of substance P and norepinephrine in callus differentiation“

Veröffentlichungen

Journal paper

Niedermair T., Kuhn V., Doranehgard F., Stange R., Wieskötter B., Beckmann J., Salmen P., Springorum H.-R., Straub R. H., Zimmer A., Grifka J., Grässel S., 2014. Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of enchondral ossification. *Matrix Biology*, 38:22-35

Abstracts

Niedermair T., Stange R., Wieskötter B., Straub R.H., Pasoldt A., Zimmer A., Grifka J., Grässel S.: The role of substance P and norepinephrine in callus differentiation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 29, Suppl.: S7, 2013

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad, Grad Celsius bzw. Grad als Winkelmaß
µA	Mikroamper
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikro Molar
µmol	Mikromol
2 x conc.	2 x konzentriert
6-OHDA	Applikation von 6-Hydroxydopamin in C57Bl/6J Mäusen, chemische Sympathetkomie
Abb.	Abbildung
Adrb2	Adrenozeptor β2
ALP	Alkalische Phosphatase
AR	Adrenerge Rezeptoren/Adrenozeptoren
BMM	"bone marrow macrophage", Deutsch: Knochenmarks-Makrophage
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	<i>Bone sialoprotein</i>
BV/TV	"Bone volume/total volume" Knochendichte
C	Celsius
C57Bl/6J	Nomenklatur der Kontrolltiere
ca.	Zirca
cDNA	"complementary DNS", deutsch: komplementäre DNS
CFU-GM	<i>colony-forming unit for granulocytes and macrophages</i>
CFU-M	<i>colony-forming unit for macrophages</i>
CGRP	<i>Calcitonin-gene related peptide</i>
cm	Zentimeter
cm/Sek	Zentimeter pro Sekunde
CMP	<i>common myeloid progenitor/</i> myeloide Vorläuferzelle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col	<i>Collagen/Kollagen</i>
Conn.D	Konnektivität [1/mm]
Cox-2	Cyclooxygenase-2
CRPS	<i>Complex regional pain syndrom/</i> komplexe regionale Schmerzsyndrom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	Destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	"Deoxyribonucleic acid", deutsch: Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	<i>Extracellular matrix/</i> Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>

Abkürzungsverzeichnis

EtOH	Ethanol
FBS	Fetal Bovine Serum
FR	Färberelikte, freie Stellen im Gewebe der gefärbten Paraffinschnitte wo das Gewebe im Verlauf des Färbeprozesses verloren ging
G	Gauge, Größenangabe bei Injektionsnadeln
g	Gramm
h	Stunde/n
HA	Hydroxyapatit
HCl	Salzsäure
hMSC	<i>Human mesenchymal stem cell</i> /humane mesenchymale Stammzelle
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i> /Hematopoietische Stammzelle
i.p.	intraperitoneal
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
iNos	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> /induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
Kath K	Kathepsin K
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kVp	kilovolt peak, maximale Röhrenspannung
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar; Mol/Liter
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
Min	Minute/n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger <i>Ribonucleic acid</i> /messenger Ribonukleinsäure
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i> /Mesenchymale Stammzelle
MV	<i>Matrix vesicles</i> /Matrix-Vesikel
N	Newton
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NCPs	<i>noncollagenous proteins</i>
ng	Nanogramm
NGS	Normal goat serum/Ziegenserum
NK1R	Neurokinin-1 Rezeptor, Substanz P Rezeptor
NKA	Neurokinin A
nM	nano Molar
Nmm	Newton Millimeter

nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NPK	Neuropeptid K
NPY	Neuropeptid Y
∅	Durchmesser
OC	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate Buffered Saline
pg	Picogramm
PG	Prostaglandine
PNS	Peripheres Nervensystem
PPT-A	Prä-Protachykinin-A Gen/ <i>Tac1 gene</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> /quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
rad	Radiant, Bogenmaß bzw. Winkelmaß
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> /Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest, zur Analyse verwendete Region
rpm	<i>rounds per minute</i> /Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2 (Cbfa1)</i>
Sek	Sekunde/n
SNF	sympathische Nervenfasern
SNS	sympathisches Nervensystem
SP	Substanz P, Produkt des Tachykinin1 Gens
Tac1-/-	Tachykinin1-defiziente Mäuse, knock out des Tachykinin1 Gens
Tb.N	Trabekelanzahl [1/cm]
Tb.Sp	Trabekelseparation bzw. -abstand [mm]
Tb.Th	Trabekeldicke [mm]
TGF-β	Transforming growth factor-β
TH	Tyrosinhydroxylase
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNAP	<i>tissue-nonspecific alkaline phosphatase</i> /Gewebe-unabhängige alkalische Phosphatase
TRAP	<i>Tartrate resistant acid phosphatase</i> /Tartrat-resistente saure Phosphatase
VOI	Volume of interest, zur Analyse verwendetes Volumen
WT	Wildtyp (C57Bl/6J Maus)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

- AARDEN LA, DE GROOT ER, SCHAAP OL AND LANSDORP PM. 1987. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *European Journal of Immunology* 17: 1411-1416.
- ADAMUS MA AND DABROWSKI ZJ. 2001. Effect of the neuropeptide substance P on the rat bone marrow-derived osteogenic cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 81: 499-506.
- AGUIRRE JI, PLOTKIN LI, STEWART SA, WEINSTEIN RS, PARFITT AM, MANOLAGAS SC AND BELLIDO T. 2006. Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss. *Journal of Bone and Mineral Research* 21: 605-615.
- AHMED M, BJURHOLM A, SCHULTZBERG M, THEODORSSON E AND KREICBERGS A. 1995. Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis. A combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis and rheumatism* 38: 699-709.
- AHMED M, SRINIVASAN GR, THEODORSSON E, BJURHOLM A AND KREICBERGS A. 1994. Extraction and quantitation of neuropeptides in bone by radioimmunoassay. *Regulatory peptides* 51: 179-188.
- AITKEN SJ, LANDAO-BASSONGA E, RALSTON SH AND IDRIS AI. 2009. β 2-Adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics* 482: 96-103.
- AKASHI K, TRAVER D, MIYAMOTO T AND WEISSMAN IL. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197.
- AKIYAMA H, CHABOISSIER M-C, MARTIN JF, SCHEDL A AND DE CROMBRUGGHE B. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development* 16: 2813-2828.
- AMLING M, TAKEDA S AND KARSENTY G. 2000. A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. *Bioessays* 22: 970-975.
- ANNABI B, LEE Y-T, TURCOTTE S, NAUD E, DESROSIERS RR, CHAMPAGNE M, ELIOPOULOS N, GALIPEAU J AND BÉLIVEAU R. 2003. Hypoxia Promotes Murine Bone-Marrow-Derived Stromal Cell Migration and Tube Formation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21: 337-347.
- AOKI M, TAMAI K AND SAOTOME K. 1994. Substance P- and calcitonin gene-related peptide-immunofluorescent nerves in the repair of experimental bone defects. *International Orthopaedics* 18: 317-324.
- APEL PJ, CRANE D, NORTHAM CN, CALLAHAN M, SMITH TL AND TEASDALL RD 2009. Effect of Selective Sensory Denervation on Fracture-Healing. An Experimental Study of Rats, n. 91, 2886-2895 p.
- ARAI M, NAGASAWA T, KOSHIHARA Y, YAMAMOTO S AND TOGARI A. 2003a. Effects of beta-adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. *Biochim Biophys Acta* 1640: 137-142.
- ARAI M, NAGASAWA T, KOSHIHARA Y, YAMAMOTO S AND TOGARI A. 2003b. Effects of β -adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1640: 137-142.
- ARASAPAM G, SCHERER M, COOL JC, FOSTER BK AND XIAN CJ. 2006. Roles of COX-2 and iNOS in the bony repair of the injured growth plate cartilage. *Journal of cellular biochemistry* 99: 450-461.
- ARCHER CW AND FRANCIS-WEST P. 2003. The chondrocyte. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35: 401-404.
- ARO H. 1985. Effect of nerve injury on fracture healing. Callus formation studied in the rat. *Acta orthopaedica Scandinavica* 56: 233-237.
- BAKKER A AND KLEIN-NULEND J 2012. Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones. In: HELFRICH, MH AND RALSTON, SH (Eds.) *Bone Research Protocols: Humana Press*, p. 19-29.
- BALDIK Y, DIWAN AD, APPELYARD RC, MING FANG Z, WANG Y AND MURRELL GAC. 2005. Deletion of iNOS gene impairs mouse fracture healing. *Bone* 37: 32-36.
- BAO CLM, TEO EY, CHONG MSK, LIU Y, CHOLANI M AND CHAN JKY 2013. *Advances in Bone Tissue Engineering. Regenerative Medicine and Tissue Engineering*.
- BAR-SHAVIT Z. 2007. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of cellular biochemistry* 102: 1130-1139.

- BARNES GL, KOSTENUK PJ, GERSTENFELD LC AND EINHORN TA. 1999. Growth factor regulation of fracture repair. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14: 1805-1815.
- BARNES PJ. 1995. Beta-adrenergic receptors and their regulation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 152: 838-860.
- BERTRAND J ET AL. 2013. Syndecan 4 supports bone fracture repair, but not fetal skeletal development, in mice. *Arthritis and rheumatism* 65: 743-752.
- BIKLE DD AND HALLORAN BP. 1999. The response of bone to unloading. *J Bone Miner Metab* 17: 233-244.
- BIRMINGHAM E, NIEBUR GL, MCHUGH PE, SHAW G, BARRY FP AND MCNAMARA LM. 2012. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European cells & materials* 23: 13-27.
- BJURHOLM A, KREICBERGS A, BRODIN E AND SCHULTZBERG M. 1988a. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 9: 165-171.
- BJURHOLM A, KREICBERGS A, TERENIUS L, GOLDSTEIN M AND SCHULTZBERG M. 1988b. Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *Journal of the autonomic nervous system* 25: 119-125.
- BOLANDER ME. 1992. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 200: 165-170.
- BOYLE WJ, SIMONET WS AND LACEY DL. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342.
- BREW K AND NAGASE H. 2010. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta* 1803: 55-71.
- BRIGHTON CT AND HUNT RM. 1991. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 73: 832-847.
- BRUDER SP, FINK DJ AND CAPLAN AI. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *Journal of cellular biochemistry* 56: 283-294.
- BUCKWALTER JA AND MANKIN HJ 1997. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions*†. n. 79, 600-611 p.
- BYLUND DB. 1992. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6: 832-839.
- CAO YQ, MANTYH PW, CARLSON EJ, GILLESPIE AM, EPSTEIN CJ AND BASBAUM AI. 1998. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 392: 390-394.
- CAPELLINO S, COSENTINO M, WOLFF C, SCHMIDT M, GRIFKA J AND STRAUB RH. 2010. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Annals of the rheumatic diseases* 69: 1853-1860.
- CAPLAN AI. 1987. Bone development and repair. *BioEssays* 6: 171-175.
- CAPLAN AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9: 641-650.
- CHO T-J, GERSTENFELD LC AND EINHORN TA. 2002. Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor β Superfamily During Murine Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 17: 513-520.
- CLAES L, RECKNAGEL S AND IGNATIUS A. 2012. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature reviews Rheumatology* 8: 133-143.
- CLAES LE AND HEIGELE CA. 1999. Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *Journal of biomechanics* 32: 255-266.
- CLAES LE, HEIGELE CA, NEIDLINGER-WILKE C, KASPAR D, SEIDL W, MARGEVICIUS KJ AND AUGAT P. 1998. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clinical orthopaedics and related research*: S132-147.
- CLAES LE, WILKE HJ, AUGAT P, RUBENACKER S AND MARGEVICIUS KJ. 1995. Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation. *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)* 10: 227-234.
- CLARKE B. 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 3: S131-S139.
- COOPER KL, OH S, SUNG Y, DASARI RR, KIRSCHNER MW AND TABIN CJ. 2013. Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature* 495: 375-378.
- CREMER MA, ROSLONIEC EF AND KANG AH. 1998. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 76: 275-288.

- CUNIN P, CAILLON A, CORVAISIER M, GARO E, SCOTET M, BLANCHARD S, DELNESTE Y AND JEANNIN P. 2011. The tachykinins substance P and hemokinin-1 favor the generation of human memory Th17 cells by inducing IL-1beta, IL-23, and TNF-like 1A expression by monocytes. *Journal of immunology* 186: 4175-4182.
- DAY TF, GUO X, GARRETT-BEAL L AND YANG Y. 2005. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell* 8: 739-750.
- DE CROMBRUGGHE B, LEFEBVRE V, BEHRINGER RR, BI W, MURAKAMI S AND HUANG W. 2000. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biology* 19: 389-394.
- DE LA MATA J, UY HL, GUISE TA, STORY B, BOYCE BF, MUNDY GR AND ROODMAN GD. 1995. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *The Journal of clinical investigation* 95: 2846-2852.
- DE VRIES F, SOUVEREIN PC, COOPER C, LEUFKENS HG AND VAN STAA TP. 2007. Use of beta-blockers and the risk of hip/femur fracture in the United Kingdom and The Netherlands. *Calcified tissue international* 80: 69-75.
- DELISE AM, FISCHER L AND TUAN RS. 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 8: 309-334.
- DILLON J, WARING-GREEN V, TAYLOR A, WILSON PM, BIRCH M, GARTLAND A AND GALLAGHER J 2012. Primary Human Osteoblast Cultures. In: HELFRICH, MH AND RALSTON, SH (Eds.) *Bone Research Protocols*: Humana Press, p. 3-18.
- DIMITRIOU R, TSIRIDIS E AND GIANNOUDIS PV. 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36: 1392-1404.
- DING DC, SHYU WC AND LIN SZ. 2011. Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation* 20: 5-14.
- DING WG, ZHANG ZM, ZHANG YH, JIANG SD, JIANG LS AND DAI LY. 2010. Changes of substance P during fracture healing in ovariectomized mice. *Regulatory peptides* 159: 28-34.
- DIWAN AD, WANG MX, JANG D, ZHU W AND MURRELL GAC. 2000. Nitric Oxide Modulates Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 15: 342-351.
- DUCY P, AMLING M, TAKEDA S, PRIEMEL M, SCHILLING AF, BEIL FT, SHEN J, VINSON C, RUEGER JM AND KARSENTY G. 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100: 197-207.
- DUCY P, ZHANG R, GEOFFROY V, RIDALL AL AND KARSENTY G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747-754.
- DUFFY RA ET AL. 2003. Centrally administered hemokinin-1 (HK-1), a neurokinin NK1 receptor agonist, produces substance P-like behavioral effects in mice and gerbils. *Neuropharmacology* 45: 242-250.
- EGHBALI-FATOURECHI GZ, LAMSAM J, FRASER D, NAGEL D, RIGGS BL AND KHOSLA S. 2005. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *The New England journal of medicine* 352: 1959-1966.
- EINHORN TA. 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*: S7-21.
- EINHORN TA. 2005. The science of fracture healing. *Journal of orthopaedic trauma* 19: S4-6.
- EINHORN TA, HIRSCHMAN A, KAPLAN C, NASHED R, DEVLIN VJ AND WARMAN J. 1989. Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus: A preliminary report. *Journal of Orthopaedic Research* 7: 792-805.
- ELEFTERIOU F ET AL. 2005. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434: 514-520.
- ELEFTERIOU F, CAMPBELL P AND MA Y. 2014. Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. *Calcified tissue international* 94: 140-151.
- ERLEBACHER A, FILVAROFF EH, GITELMAN SE AND DERYNCK R. 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80: 371-378.
- EVERDING J. 2013. Untersuchung des Einflusses von Integrin $\alpha 2\beta 1$ auf den nativen Knochen im Alterungsprozess und die Frakturheilung anhand der Integrin $\alpha 2$ -Knock-out Maus. Dissertation Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- FERGUSON CM, MICLAU T, HU D, ALPERN E AND HELMS JA. 1998. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Annals of the New York Academy of Sciences* 857: 33-42.
- FONSECA TL ET AL. 2011. Double disruption of $\alpha 2A$ - and $\alpha 2C$ -adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26: 591-603.
- GERSTENFELD LC, CULLINANE DM, BARNES GL, GRAVES DT AND EINHORN TA. 2003. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry* 88: 873-884.

- GIANNOUDIS PV, EINHORN TA AND MARSH D. 2007. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38 Suppl 4: S3-6.
- GOLDRING MB, TSUCHIMOCHI K AND IJIRI K. 2006. The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 97: 33-44.
- GOODSHIP AE, CUNNINGHAM JL AND KENWRIGHT J. 1998. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*: S105-115.
- GOTO T, NAKAO K, GUNJIGAKE KK, KIDO MA, KOBAYASHI S AND TANAKA T. 2007. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides* 41: 25-31.
- GOTO T, YAMAZA T, KIDO MA AND TANAKA T. 1998. Light- and electron-microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell and tissue research* 293: 87-93.
- GOWEN M ET AL. 1999. Cathepsin K Knockout Mice Develop Osteopetrosis Due to a Deficit in Matrix Degradation but Not Demineralization. *Journal of Bone and Mineral Research* 14: 1654-1663.
- GRAHAM RM, PEREZ DM, HWA J AND PIASCIK MT. 1996. α 1-Adrenergic Receptor Subtypes : Molecular Structure, Function, and Signaling. *Circulation Research* 78: 737-749.
- GRASSEL S. 2014. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Research & Therapy* 16: 485.
- GUO TZ, OFFLEY SC, BOYD EA, JACOBS CR AND KINGERY WS. 2004. Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain* 108: 95-107.
- HALL BK AND MIYAKE T. 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22: 138-147.
- HANKEMEIER S, GRASSEL S, PLENZ G, SPIEGEL HU, BRUCKNER P AND PROBST A. 2001. Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 19: 531-538.
- HARADA S AND RODAN GA. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-355.
- HARLE P, MOBIUS D, CARR DJ, SCHOLMERICH J AND STRAUB RH. 2005. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* 52: 1305-1313.
- HARRISON S AND GEPPETTI P. 2001. Substance p. *The international journal of biochemistry & cell biology* 33: 555-576.
- HARTMANN C. 2006. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in cell biology* 16: 151-158.
- HEYMANN D AND ROUSSELLE AV. 2000. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 12: 1455-1468.
- HILDEBRAND T, LAIB A, MÜLLER R, DEQUEKER J AND RÜEGSEGGER P. 1999. Direct Three-Dimensional Morphometric Analysis of Human Cancellous Bone: Microstructural Data from Spine, Femur, Iliac Crest, and Calcaneus. *Journal of Bone and Mineral Research* 14: 1167-1174.
- HILL EL, TURNER R AND ELDE R. 1991. Effects of neonatal sympathectomy and capsaicin treatment on bone remodeling in rats. *Neuroscience* 44: 747-755.
- HILTUNEN A, ARO HT AND VUORIO E. 1993. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clinical orthopaedics and related research*: 23-27.
- HOLMBECK K ET AL. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99: 81-92.
- HUANG C, XUE M, CHEN H, JIAO J, HERSCHMAN HR, O'KEEFE RJ AND ZHANG X. 2014. The spatiotemporal role of COX-2 in osteogenic and chondrogenic differentiation of periosteum-derived mesenchymal progenitors in fracture repair. *PloS one* 9: e100079.
- HUANG HH, BRENNAN TC, MUIR MM AND MASON RS. 2009a. Functional alpha1- and beta2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *Journal of cellular physiology* 220: 267-275.
- HUANG HH, BRENNAN TC, MUIR MM AND MASON RS. 2009b. Functional α 1- and β 2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology* 220: 267-275.
- HUKKANEN M, KONTTINEN YT, SANTAVIRTA S, PAAVOLAINEN P, GU XH, TERENGGHI G AND POLAK JM. 1993. Rapid proliferation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves during healing of rat tibial fracture suggests neural involvement in bone growth and remodelling. *Neuroscience* 54: 969-979.
- IMAI S AND MATSUSUE Y. 2002. Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. *Microscopy research and technique* 58: 61-69.

- JAISWAL N, HAYNESWORTH SE, CAPLAN AI AND BRUDER SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 64: 295-312.
- JENEI-LANZL Z, GRASSEL S, PONGRATZ G, KEES F, MIOGGE N, ANGELE P AND STRAUB R. 2014a. Norepinephrine inhibits mesenchymal stem cell and chondrogenic progenitor cell chondrogenesis and accelerates chondrogenic hypertrophy. *Arthritis and rheumatism* 66: 2472 - 2481.
- JENEI-LANZL Z, GRÄSSEL S, PONGRATZ G, KEES F, MIOGGE N, ANGELE P AND STRAUB RH. 2014b. Norepinephrine Inhibition of Mesenchymal Stem Cell and Chondrogenic Progenitor Cell Chondrogenesis and Acceleration of Chondrogenic Hypertrophy. *Arthritis & Rheumatology* 66: 2472-2481.
- JONES KB, MOLLANO AV, MORCUENDE JA, COOPER RR AND SALTZMAN CL. 2004. Bone and brain: a review of neural, hormonal, and musculoskeletal connections. *The Iowa orthopaedic journal* 24: 123-132.
- KALERVO VÄÄNÄNEN H, SALO J AND LEHENKARI P. 1996. Mechanism of osteoclast-mediated bone resorption. *J Bone Miner Metab* 14: 187-192.
- KARSENTY G. 2001. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology* 142: 2731-2733.
- KATAGIRI T, YAMAGUCHI A, KOMAKI M, ABE E, TAKAHASHI N, IKEDA T, ROSEN V, WOZNEY JM, FUJISAWA-SEHARA A AND SUDA T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *The Journal of cell biology* 127: 1755-1766.
- KEVORKIAN L, YOUNG DA, DARRAH C, DONELL ST, SHEPSTONE L, PORTER S, BROCKBANK SMV, EDWARDS DR, PARKER AE AND CLARK IM. 2004. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis & Rheumatism* 50: 131-141.
- KINGERY WS, OFFLEY SC, GUO TZ, DAVIES MF, CLARK JD AND JACOBS CR. 2003. A substance P receptor (NK1) antagonist enhances the widespread osteoporotic effects of sciatic nerve section. *Bone* 33: 927-936.
- KINI U AND NANDEESH B 2012. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging: Springer*, p. 29-57.
- KLEIN P, SCHELL H, STREITPARTH F, HELLER M, KASSI J-P, KANDZIORA F, BRAGULLA H, HAAS NP AND DUDA GN. 2003. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *Journal of Orthopaedic Research* 21: 662-669.
- KNUDSON CB AND KNUDSON W. 2001. Cartilage proteoglycans. *Seminars in cell & developmental biology* 12: 69-78.
- KOJIMA T, YAMAGUCHI M AND KASAI K. 2006. Substance P stimulates release of RANKL via COX-2 expression in human dental pulp cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 55: 78-84.
- KOMORI T. 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular biochemistry* 99: 1233-1239.
- KOMORI T ET AL. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
- KON T, CHO TJ, AIZAWA T, YAMAZAKI M, NOOH N, GRAVES D, GERSTENFELD LC AND EINHORN TA. 2001. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16: 1004-1014.
- KONDO H, NIFUJI A, TAKEDA S, EZURA Y, RITTLING SR, DENHARDT DT, NAKASHIMA K, KARSENTY G AND NODA M. 2005. Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *The Journal of biological chemistry* 280: 30192-30200.
- KONDO H, TAKEUCHI S AND TOGARI A. 2013. beta-Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 304: E507-515.
- KOSHER RA, KULYK WM AND GAY SW. 1986. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *The Journal of cell biology* 102: 1151-1156.
- KURIHARA N, BERTOLINI D, SUDA T, AKIYAMA Y AND ROODMAN GD. 1990. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 144: 4226-4230.
- KVETNANSKY R, SABBAN EL AND PALKOVITS M. 2009. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological reviews* 89: 535-606.

- KWAN TAT S, PADRINES M, THEOLEYRE S, HEYMANN D AND FORTUN Y. 2004. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews* 15: 49-60.
- LAJTHA LG. 1979. *Stem Cell Concepts*. *Differentiation* 14: 23-33.
- LANGE J, SAPOZHNIKOVA A, LU C, HU D, LI X, MICLAU T, 3RD AND MARCUCIO RS. 2010. Action of IL-1beta during fracture healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28: 778-784.
- LAU KH, KOTHARI V, DAS A, ZHANG XB AND BAYLINK DJ. 2013. Cellular and molecular mechanisms of accelerated fracture healing by COX2 gene therapy: studies in a mouse model of multiple fractures. *Bone* 53: 369-381.
- LEFEBVRE V, HUANG W, HARLEY VR, GOODFELLOW PN AND DE CROMBRUGGHE B. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Molecular and cellular biology* 17: 2336-2346.
- LEFEBVRE V, LI P AND DE CROMBRUGGHE B. 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *The EMBO journal* 17: 5718-5733.
- LERNER UH. 2002. Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2: 440-447.
- LI J, AHMAD T, SPETEA M, AHMED M AND KREICBERGS A. 2001. Bone reinnervation after fracture: a study in the rat. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16: 1505-1510.
- LI J, AHMED M, BERGSTROM J, ACKERMANN P, STARK A AND KREICBERGS A. 2010. Occurrence of substance P in bone repair under different load comparison of straight and angulated fracture in rat tibia. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28: 1643-1650.
- LI WW, GUO TZ, LIANG DY, SUN Y, KINGERY WS AND CLARK JD. 2012. Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology* 116: 882-895.
- LIEU S, HANSEN E, DEDINI R, BEHONICK D, WERB Z, MICLAU T, MARCUCIO R AND COLNOT C. 2011. Impaired remodeling phase of fracture repair in the absence of matrix metalloproteinase-2. *Disease models & mechanisms* 4: 203-211.
- LIN Z, WILLERS C, XU J AND ZHENG MH. 2006. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue engineering* 12: 1971-1984.
- LINSENMAYER TF, CHEN QA, GIBNEY E, GORDON MK, MARCHANT JK, MAYNE R AND SCHMID TM. 1991. Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Development* 111: 191-196.
- LIU D, JIANG LS AND DAI LY. 2007. Substance P and its receptors in bone metabolism. *Neuropeptides* 41: 271-283.
- LOWIK CW, VAN DER PLUIJM G, BLOYS H, HOEKMAN K, BIJVOET OL, AARDEN LA AND PAPAPOULOS SE. 1989. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 162: 1546-1552.
- MADSEN JE, HUKKANEN M, AUNE AK, BASRAN I, MOLLER JF, POLAK JM AND NORDSLETTEN L. 1998. Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats. *Clinical orthopaedics and related research*: 230-240.
- MALIZOS KN AND PAPTAEODOROU LK. 2005. The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* 36 Suppl 3: S13-19.
- MARKS SC AND POPOFF SN. 1988. Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy* 183: 1-44.
- MARSELL R AND EINHORN TA. 2011. The biology of fracture healing. *Injury* 42: 551-555.
- MASSOVA I, KOTRA LP, FRIDMAN R AND MOBASHERY S. 1998. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12: 1075-1095.
- MATAYOSHI T, GOTO T, FUKUHARA E, TAKANO H, KOBAYASHI S AND TAKAHASHI T. 2005. Neuropeptide substance P stimulates the formation of osteoclasts via synovial fibroblastic cells. *Biochemical and biophysical research communications* 327: 756-764.
- MATIAS-ROMAN S, GALVEZ BG, GENIS L, YANEZ-MO M, DE LA ROSA G, SANCHEZ-MATEOS P, SANCHEZ-MADRID F AND ARROYO AG. 2005. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium. *Blood* 105: 3956-3964.

Literaturverzeichnis

- MINKIN C. 1982. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified tissue international* 34: 285-290.
- MINKOWITZ B, BOSKEY AL, LANE JM, PEARLMAN HS AND VIGORITA VJ. 1991. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9: 869-875.
- MOLINOFF PB AND AXELROD J. 1971. Biochemistry of catecholamines. *Annual review of biochemistry* 40: 465-500.
- MORI T, OGATA T, OKUMURA H, SHIBATA T, NAKAMURA Y AND KATAOKA K. 1999a. Substance P Regulates the Function of Rabbit Cultured Osteoclast; Increase of Intracellular Free Calcium Concentration and Enhancement of Bone Resorption. *Biochemical and biophysical research communications* 262: 418-422.
- MORI T, OGATA T, OKUMURA H, SHIBATA T, NAKAMURA Y AND KATAOKA K. 1999b. Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption. *Biochemical and biophysical research communications* 262: 418-422.
- MUIR H. 1995. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays* 17: 1039-1048.
- MÜLLER R AND RÜEGSEGG P. 1997. Micro-tomographic imaging for the nondestructive evaluation of trabecular bone architecture. *Studies in health technology and informatics* 40: 61-79.
- MURAKAMI S, LEFEBVRE V AND DE CROMBRUGGHE B. 2000. Potent Inhibition of the Master Chondrogenic Factor Sox9 Gene by Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α . *Journal of Biological Chemistry* 275: 3687-3692.
- NAKAHARA H, BRUDER SP, HAYNESWORTH SE, HOLECEK JJ, BABER MA, GOLDBERG VM AND CAPLAN AI. 1990. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11: 181-188.
- NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, ZHANG Z, DENG JM, BEHRINGER RR AND DE CROMBRUGGHE B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29.
- NG KW, ROMAS E, DONNAN L AND FINDLAY DM. 1997. Bone biology. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 11: 1-22.
- NILSSON J, VON EULER AM AND DALSGAARD CJ. 1985. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315: 61-63.
- NISHIURA T AND ABE K. 2007. Alpha1-adrenergic receptor stimulation induces the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand gene via protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase pathways in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Archives of oral biology* 52: 778-785.
- NORDSLETEN L, MADSEN JE, ALMAAS R, ROOTWELT T, HALSE J, KONTTINEN YT, HUKKANEN M AND SANTAVIRTA S. 1994. The neuronal regulation of fracture healing. Effects of sciatic nerve resection in rat tibia. *Acta orthopaedica Scandinavica* 65: 299-304.
- OFFLEY SC, GUO TZ, WEI T, CLARK JD, VOGEL H, LINDSEY DP, JACOBS CR, YAO W, LANE NE AND KINGERY WS. 2005. Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20: 257-267.
- OHUCHI E, IMAI K, FUJII Y, SATO H, SEIKI M AND OKADA Y. 1997. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *The Journal of biological chemistry* 272: 2446-2451.
- OLMEDO ML, LANDRY PS, SADASIVAN KK, ALBRIGHT JA, MEEK WD, ROUTH R AND MARINO AA. 1999. Regulation of osteoblast levels during bone healing. *Journal of orthopaedic trauma* 13: 356-362.
- OLSEN BR, REGINATO AM AND WANG W. 2000. Bone development. *Annual review of cell and developmental biology* 16: 191-220.
- OPOŁKA A, STRAUB RH, PASOLDT A, GRIFKA J AND GRASSEL S. 2012. Substance P and norepinephrine modulate murine chondrocyte proliferation and apoptosis. *Arthritis and rheumatism* 64: 729-739.
- OREFFO RO, COOPER C, MASON C AND CLEMENTS M. 2005. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem cell reviews* 1: 169-178.
- ORRIS I AND ARNETT T 2012. Rodent Osteoclast Cultures. In: HELFRICH, MH AND RALSTON, SH (Eds.) *Bone Research Protocols: Humana Press*, p. 103-117.
- OTTO F ET AL. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-771.

- PACIFICI M, GOLDEN EB, OSHIMA O, SHAPIRO IM, LEBOY PS AND ADAMS SL. 1990. Hypertrophic Chondrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 599: 45-57.
- PAUWELS F. 1960. Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. *Z Anat Entwickl Gesch* 121: 478-515.
- PENNEFATHER JN, LECCI A, CANDENAS ML, PATAK E, PINTO FM AND MAGGI CA. 2004. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life sciences* 74: 1445-1463.
- PEREZ-CASTRILLON JL, VEGA G, ABAD L, SANZ A, MENDO M, PORRERO MG AND DUENAS A. 2007. Effect of beta-blockers on bone mass and biomechanical parameters of the femoral neck in males with acute myocardial infarction. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 74: 259-262.
- PERKINS R AND SKIRVING AP. 1987. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 69: 521-524.
- PITTINGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S AND MARSHAK DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- PROCKOP DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, NY)* 276: 71-74.
- RAYMOND JR, HNATOWICH M, LEFKOWITZ RJ AND CARON MG. 1990. Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension* 15: 119-131.
- RIES C, EGEA V, KAROW M, KOLB H, JOCHUM M AND NETH P. 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109: 4055-4063.
- RODRIGUEZ-PALLARES J, PARGA JA, MUNOZ A, REY P, GUERRA MJ AND LABANDEIRA-GARCIA JL. 2007. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of neurochemistry* 103: 145-156.
- ROSENBAUM DM, RASMUSSEN SGF AND KOBILKA BK. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-363.
- ROSS FP AND TEITELBAUM SL. 2005. alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunological reviews* 208: 88-105.
- RUBIN J AND GREENFIELD E 2005. Osteoclast: Origin and Differentiation. In: BRONNER, F, FARACH-CARSON, M AND RUBIN, J (Eds.) *Bone Resorption*: Springer London, p. 1-23.
- RUMI MN, DEOL GS, SINGAPURI KP AND PELLEGRINI VD, JR. 2005. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 23: 34-40.
- SACHS C AND JONSSON G. 1975. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochemical pharmacology* 24: 1-8.
- SANDHU HS, HERSKOVITS MS AND SINGH IJ. 1987. Effect of surgical sympathectomy on bone remodeling at rat incisor and molar root sockets. *The Anatomical record* 219: 32-38.
- SAPIR-KOREN R AND LIVSHITS G. 2011. Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis. *IBMS BoneKEy* 8: 286-300.
- SCHINDELER A, MCDONALD MM, BOKKO P AND LITTLE DG. 2008. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in cell & developmental biology* 19: 459-466.
- SCHLIENGER RG, KRAENZLIN ME, JICK SS AND MEIER CR. 2004. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 292: 1326-1332.
- SCHMIDMAIER G, WILDEMANN B, MELIS B, KRUMMREY G, EINHORN T, HAAS N AND RASCHKE M. 2004. Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma* 30: 35-42.
- SEVERINI C, IMPROTA G, FALCONIERI-ERSPAMER G, SALVADORI S AND ERSPAMER V. 2002. The tachykinin peptide family. *Pharmacological reviews* 54: 285-322.
- SFEIR C, HO L, DOLL B, AZARI K AND HOLLINGER J 2005. Fracture Repair. In: LIEBERMAN, J AND FRIEDLAENDER, G (Eds.) *Bone Regeneration and Repair*: Humana Press, p. 21-44.
- SHAPIRO IM, ADAMS CS, FREEMAN T AND SRINIVAS V. 2005. Fate of the hypertrophic chondrocyte: Microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 75: 330-339.
- SHERMAN BE AND CHOLE RA. 1995. A mechanism for sympathectomy-induced bone resorption in the middle ear. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 113: 569-581.
- SHIH C AND BERNARD GW. 1997. Neurogenic substance P stimulates osteogenesis in vitro. *Peptides* 18: 323-326.

- SISASK G. 2009. Bone Development and the Nervous System. Acta Universitatis Upsaliensis Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine.
- SON B-R, MARQUEZ-CURTIS LA, KUCIA M, WYSOCZYNSKI M, TURNER AR, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ AND JANOWSKA-WIECZOREK A. 2006. Migration of Bone Marrow and Cord Blood Mesenchymal Stem Cells In Vitro Is Regulated by Stromal-Derived Factor-1-CXCR4 and Hepatocyte Growth Factor-c-met Axes and Involves Matrix Metalloproteinases. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 24: 1254-1264.
- SPENCER RF. 1987. The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 69: 525-528.
- SPENGLER RN, CHENSUE SW, GIACHERIO DA, BLENK N AND KUNKEL SL. 1994. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *Journal of immunology* 152: 3024-3031.
- ST-JACQUES B, HAMMERSCHMIDT M AND MCMAHON AP. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development* 13: 2072-2086.
- STAMENKOVIĆ I. 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology* 200: 448-464.
- STEINHOFF MS, VON MENTZER B, GEPPETTI P, POTHOUKAKIS C AND BUNNETT NW 2014. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. n. 94, 265-301 p.
- STRAUB RH, GRUM F, STRAUCH U, CAPELLINO S, BATAILLE F, BLEICH A, FALK W, SCHOLMERICH J AND OBERMEIER F. 2008. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* 57: 911-921.
- STRAUB RH, WIEST R, STRAUCH UG, HARLE P AND SCHOLMERICH J. 2006. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut* 55: 1640-1649.
- STREET J ET AL. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9656-9661.
- STUDER D, MILLAN C, OZTURK E, MANIURA-WEBER K AND ZENOBI-WONG M. 2012. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *European cells & materials* 24: 118-135; discussion 135.
- SUGA S, GOTO S AND TOGARI A. 2010a. Demonstration of direct neurite-osteoclastic cell communication in vitro via the adrenergic receptor. *Journal of pharmacological sciences* 112: 184-191.
- SUGA S, GOTO S AND TOGARI A. 2010b. Demonstration of Direct Neurite–Osteoclastic Cell Communication In Vitro via the Adrenergic Receptor. *Journal of Pharmacological Sciences* 112: 184-191.
- SURI C, JONES PF, PATAN S, BARTUNKOVA S, MAISONPIERRE PC, DAVIS S, SATO TN AND YANCOPOULOS GD. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171-1180.
- TAGUCHI Y, YAMAMOTO M, YAMATE T, LIN SC, MOCHARLA H, DETOGNI P, NAKAYAMA N, BOYCE BF, ABE E AND MANOLAGAS SC. 1998. Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proceedings of the Association of American Physicians* 110: 559-574.
- TAKARADA T, HOJO H, IEMATA M, SAHARA K, KODAMA A, NAKAMURA N, HINOI E AND YONEDA Y. 2009. Interference by adrenaline with chondrogenic differentiation through suppression of gene transactivation mediated by Sox9 family members. *Bone* 45: 568-578.
- TAKEDA S, ELEFTERIOU F, LEVASSEUR R, LIU X, ZHAO L, PARKER KL, ARMSTRONG D, DUCY P AND KARSENTY G. 2002. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111: 305-317.
- TAKEUCHI T, TSUBOI T, ARAI M AND TOGARI A. 2001. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochemical pharmacology* 61: 579-586.
- TAMURA T, UDAGAWA N, TAKAHASHI N, MIYAURA C, TANAKA S, YAMADA Y, KOISHIHARA Y, OHSUGI Y, KUMAKI K AND TAGA T. 1993. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 11924-11928.
- TANAKA S, TAKAHASHI N, UDAGAWA N, TAMURA T, AKATSU T, STANLEY ER, KUROKAWA T AND SUDA T. 1993. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *The Journal of clinical investigation* 91: 257-263.
- TEITELBAUM SL AND ROSS FP. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews Genetics* 4: 638-649.

- TOGARI A. 2002a. Adrenergic regulation of bone metabolism: Possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microscopy research and technique* 58: 77-84.
- TOGARI A. 2002b. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microscopy research and technique* 58: 77-84.
- TONDRAVI MM, MCKERCHER SR, ANDERSON K, ERDMANN JM, QUIROZ M, MAKI R AND TEITELBAUM SL. 1997. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 386: 81-84.
- VORTKAMP A 2006. Regulation der Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge: Parakrine Signalsysteme. In: GANTEN, D, RUCKPAUL, K AND KÖHRLE, J (Eds.) *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*: Springer Berlin Heidelberg, p. 461-477.
- WANG K, VISHWANATH P, EICHLER GS, AL-SEBAEI MO, EDGAR CM, EINHORN TA, SMITH TF AND GERSTENFELD LC. 2006. Analysis of fracture healing by large-scale transcriptional profile identified temporal relationships between metalloproteinase and ADAMTS mRNA expression. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 25: 271-281.
- WANG L, ZHAO R, SHI X, WEI T, HALLORAN BP, CLARK DJ, JACOBS CR AND KINGERY WS. 2009. Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity in vitro. *Bone* 45: 309-320.
- WENNBERG C, HESSLE L, LUNDBERG P, MAURO S, NARISAWA S, LERNER UH AND MILLÁN JL. 2000. Functional Characterization of Osteoblasts and Osteoclasts from Alkaline Phosphatase Knockout Mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 15: 1879-1888.
- WIENS M, ETMINAN M, GILL SS AND TAKKOCHE B. 2006. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *Journal of internal medicine* 260: 350-362.
- WITTRANT Y, THEOLEYRE S, COUILLAUD S, DUNSTAN C, HEYMANN D AND REDINI F. 2003. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochemical and biophysical research communications* 310: 774-778.
- WOOLF C AND WIESENFELD-HALLIN Z. 1986. Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate the gain of the nociceptive flexor withdrawal reflex in the rat. *Neuroscience Letters* 66: 226-230.
- YAMAGISHI M AND YOSHIMURA Y. 1955. The biomechanics of fracture healing. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 37-a: 1035-1068.
- YANG G, ZHU L, HOU N, LAN Y, WU X-M, ZHOU B, TENG Y AND YANG X. 2014a. Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res* 24: 1266-1269.
- YANG L, TSANG KY, TANG HC, CHAN D AND CHEAH KSE. 2014b. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 12097-12102.
- YANG X, RICCIARDI BF, HERNANDEZ-SORIA A, SHI Y, CAMACHO NP AND BOSTROM MPG. 2007. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 41: 928-936.
- ZHANG X, SCHWARZ EM, YOUNG DA, PUZAS JE, ROSIER RN AND O'KEEFE RJ. 2002. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *The Journal of clinical investigation* 109: 1405-1415.
- ZHANG Y, LU L, FURLONGER C, WU G AND PAIGE C. 2000. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol* 1: 392 - 397.
- ZHOU Z, APTE SS, SOININEN R, CAO R, BAAKLINI GY, RAUSER RW, WANG J, CAO Y AND TRYGGVASON K. 2000. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4052-4057.
- ZHU W, DIWAN AD, LIN J-H AND MURRELL GAC. 2001. Nitric Oxide Synthase Isoforms During Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 16: 535-540.
- ZICHE M, MORBIDELLI L, MASINI E, AMERINI S, GRANGER HJ, MAGGI CA, GEPPETTI P AND LEDDA F. 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *Journal of Clinical Investigation* 94: 2036-2044.
- ZIMMER A, ZIMMER AM, BAFFI J, USDIN T, REYNOLDS K, KONIG M, PALKOVITS M AND MEZEY E. 1998. Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2630-2635.